



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**JOSE DIOGO LIMA MARTINS**

**EFEITO GASTROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DA  
*Lippia gracilis* Schauer (VERBENACEAE)**

**SÃO CRISTÓVÃO  
2017**

**JOSE DIOGO LIMA MARTINS**

**EFEITO GASTROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DA  
*Lippia gracilis* Schauer (VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sara Maria Thomazzi

**SÃO CRISTÓVÃO  
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M386e      Martins, José Diogo Lima  
              Efeito gastroprotetor do óleo essencial da *Lippia gracilis*  
              Schauer (Verbenaceae) / José Diogo Lima Martins ; orientadora  
              Sara Maria Thomazzi. – São Cristóvão, 2017.  
              60 f. : il.

              Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –  
              Universidade Federal de Sergipe, 2017.

              1. Úlcera gástrica. 2. *Lippia* (Gênero). 3. Essências e óleos  
              essenciais – Uso terapêutico. 4. Produtos naturais. I. Thomazzi, Sara  
              Maria, orient. II. Título.

CDU 612.326:582.929.3

**JOSE DIOGO LIMA MARTINS**

**EFEITO GASTROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DA  
*Lippia gracilis* Schauer (VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sara Maria Thomazzi**

**1º Examinador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo**

**2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jullyana de Souza Siqueira Quintans**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, irmãos e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A professora Dr<sup>a</sup> Sara Thomazzi pela paciência na orientação, pelos ensinamentos e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação.

Aos amigos e colegas do LAFID, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

Aos colegas do PROCFIS pelos enriquecedores debates.

A CNPQ e FAPITEC-SE pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal de Sergipe, sem a qual nada disso seria possível.

## RESUMO

EFEITO GASTROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Lippia gracilis* Schauer (VERBENACEAE), José Diogo Lima Martins, São Cristóvão, 2016.

A úlcera gástrica é uma doença que acomete grande parcela da população mundial, com prevalência de 2,4% na população ocidental e com taxas de incidência anuais de 0,10% a 0,19%, com alta taxa de cura, porém com elevado índice de recorrência. O óleo essencial (OE) da *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) é utilizado popularmente no tratamento de diversos distúrbios e apresenta atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, mas seu efeito gastroprotetor ainda não foi estudado. Os animais foram tratados com OE nas doses de 20,60 e 180 mg/kg). Foi utilizado o modelo de úlceras agudas induzidas por etanol/HCl para avaliar o efeito gastroprotetor do OE e investigar alguns possíveis mecanismos envolvidos. Os animais foram pré-tratados com ioimbina (antagonista  $\alpha$ -adrenérgico), glibenclamida (bloqueador dos canais  $K_{ATP}$ ), L-NAME (inibidor da síntese de NO), NEM (bloqueador de grupamento sulfidrílicos), indometacina (anti-inflamatório não esteroide) e todos foram tratados com OE (180mg/kg). O modelo de ligadura de piloro foi utilizado para avaliar efeito do OE sobre a secreção de muco e acidez gástrica. E a ação do OE sobre a atividade da  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase avaliada por ensaio *in vitro*. Observamos que o OE preveniu de forma dose-dependente as lesões provocadas pelo etanol/HCl, com diminuição de edema e perdas de células epiteliais. O efeito gastroprotetor do OE foi diminuído de forma parcial pelos pré-tratamentos com L-NAME, glibenclamida, indometacina e ioimbina, e total com NEM. No modelo de ligadura de piloro o OE aumentou a produção de muco, foi capaz de aumentar o pH do suco gástrico, diminuir o volume de secreção e a concentração de  $H^+$ . O OE inibiu a atividade da  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase. Estes resultados comprovam que o OE de *Lippia gracilis* possui efeito gastroprotetor, diminuindo a secreção gástrica e estimulando fatores protetores, com participação de NO, grupamentos sulfidrílicos, receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, prostaglandinas e canais  $K_{ATP}$ .

**Palavras-chave :** Gastroproteção; Úlcera Gástrica; *Lippia Gracilis*; Óleo essencial; Produto natural.

## ABSTRACT

GASTROPROTECTIVE EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL from *Lippia gracilis* Schauer (VERBENACEAE), José Diogo Lima Martins, São Cristóvão, 2016.

Gastric ulcer is a disease that affects a large part of the world population, with a prevalence of 2.4% in the Western population and with annual incidence rates of 0.10% to 0.19%, with a high cure rate, but with a high recurrence rate. The essential oil (OE) of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) is popularly used in the treatment of various disorders and presents antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities, but its gastroprotective effect has not been studied yet. The animals were treated with OE at doses of 20, 60 and 180 mg/kg). The acute ethanol/HCl induced ulcer model was used to evaluate the gastroprotective effect of OE and to investigate some possible mechanisms involved. The animals were pre-treated with yohimbine ( $\alpha$ -adrenergic antagonist), glibenclamide (KATP channel blocker), L-NAME (NO synthesis inhibitor), NEM (sulfhydryl grouping blocker), indomethacin (nonsteroidal anti-inflammatory) And all were treated with OE (180 mg/kg). The pylorus ligation model was used to evaluate the effect of OE on mucus secretion and gastric acidity. And the action of OE on the activity of  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase evaluated by in vitro assay. We observed that OE dose-dependently prevented lesions caused by ethanol/HCl, with decreased edema and loss of epithelial cells. The gastroprotective effect of OE was partially diminished by pre-treatments with L-NAME, glibenclamide, indomethacin and yohimbine, and total with NEM. In the pylori ligation model OE increased mucus production, it was able to increase the pH of the gastric juice, decrease the volume of secretion and  $[H^+]$ . OE inhibited the activity of  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase. These results confirm that *Lippia gracilis* OE has a gastroprotective effect, decreasing gastric secretion and stimulating protective factors, with NO participation, sulfhydryl groups,  $\alpha$ -adrenergic receptors, prostaglandins and KATP channels.

**Key-words:** Gastroprotection; Gastric ulcer; *Lippia gracilis*; Essential oil; Natural product.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição de óleo essencial das folhas da <i>Lippia gracilis</i> .....   | 24 |
| <b>Tabela 2.</b> O efeito do óleo essencial (OE) da <i>Lippia gracilis</i> em danos microscópicos induzidos por etanol / HCl na mucosa gástrica.....   | 27 |
| <b>Tabela 3.</b> Avaliação do papel dos $\alpha_2$ -adrenoceptores, compostos sulfidrílicos, óxido nítrico, canais para $K_{ATP}$ e prostaglandinas no efeito gastroprotetor do óleo essencial (OE) da <i>Lippia gracilis</i> contra lesões gástricas induzidas por etanol/HCl em camundongos..... | 30 |
| <b>Tabela 4.</b> Efeito do óleo essencial (EO) da <i>Lippia gracilis</i> , administrado intraduodenalmente, nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico obtido a partir da ligadura de piloro em camundongos .....   | 32 |
| <b>Figura 1.</b> Esquema ilustrando a regulação da secreção de ácido gástrico.....   | 06 |
| <b>Figura 2.</b> <i>Lippia gracilis</i> Schauer (Verbenaceae).....   | 13 |
| <b>Figura 3.</b> Cromatograma CG-FID do óleo essencial de folhas da <i>Lippia gracilis</i> .....   | 25 |
| <b>Figura 4.</b> O efeito do óleo essencial (OE) da <i>Lippia gracilis</i> na prevenção de danos gástricos induzidos por etanol/HCl .....  | 26 |
| <b>Figura 5.</b> Avaliação microscópica do efeito gastroprotetor do óleo essencial (OE) da <i>Lippia gracilis</i> no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado ..   | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Efeito do óleo essencial (OE) da <i>Lippia gracilis</i> , administrado intraduodenalmente, na ligação do azul de Alcian ao muco gástrico livre a partir da ligadura de piloro.....  | 31 |
| <b>Figura 7.</b> Efeito <i>in vitro</i> do óleo essencial (OE) da <i>Lippia gracilis</i> na atividade da $H^+, K^+$ ATPase .....   | 33 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |  |
|------------------------|--|
| AINES.....             | anti-inflamatórios não esteroidais               |
| ANOVA.....             | análise de variância                             |
| CCK-2.....             | receptor de colecistocinina                      |
| M <sub>3</sub> .....   | receptor muscarínico                             |
| CG .....               | cromatografia gasosa                             |
| COX.....               | ciclo-oxigenases                                 |
| des.....               | desorganização                                   |
| DMSO.....              | Dimetilsulfóxido                                 |
| ed .....               | edema  |
| EPM.....               | erro padrão da média                             |
| GCs .....              | guanilato ciclase solúvel                        |
| GMPc .....             | Guanosina monofosfato cíclico                    |
| GPx .....              | Glutathione peroxidase                           |
| GSH.....               | Glutathione reduzida                             |
| HE .....               | hematoxilina-eosina                              |
| IBPs.....              | inibidores da bomba de prótons                   |
| K <sub>ATP</sub> ..... | K <sup>+</sup> sensíveis a ATP                   |
| L-NAME .....           | Nw-nitro-L-arginina cloridrato do éster metílico |
| NEM .....              | N-etilmaleimida                                  |
| NO .....               | Óxido nítrico                                    |
| NOS.....               | sintase do óxido nítrico                         |
| NOS <sub>c</sub> ..... | sintase do óxido nítrico constitutiva            |
| NOS <sub>i</sub> ..... | sintase do óxido nítrico induzível               |
| OE .....               | óleo essencial                                   |
| PG <sub>s</sub> .....  | prostaglandinas                                  |
| PGE .....              | prostaglandina E                                 |
| EP.....                | receptor de prostaglandina E                     |
| PGI .....              | prostaciclina                                    |
| IP .....               | receptor de prostaciclina                        |
| Pi .....               | fosfato inorgânico                               |
| SH .....               | Compostos sulfidrílicos                          |
| SOD.....               | Superóxido dismutase                             |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....   | 4  |
| 2.1 ÚLCERA GÁSTRICA.....  | 4  |
| 2.2 FISIOLOGIA GÁSTRICA.....  | 5  |
| 2.3 GASTROPROTEÇÃO.....   | 8  |
| 2.4 TERAPÊUTICA ATUAL.....  | 11 |
| 2.5 <i>Lippia gracilis</i> .....  | 12 |
| 3. OBJETIVOS.....   | 15 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....   | 15 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 15 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 16 |
| 4.1 PLANTA.....   | 16 |
| 4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....  | 16 |
| 4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO .....  | 16 |
| 4.4 DROGAS.....   | 17 |
| 4.5 ANIMAIS .....   | 18 |
| 4.6 ATIVIDADE ANTIÚLCERATIVA.....   | 18 |
| 4.6.1 ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO.....   | 18 |
| 4.6.2 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia gracilis</i> EM ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO ..... | 19 |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DO MUCO NA PAREDE GÁSTRICA .....   | 19 |
| 4.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTISSECRETORES.....  | 20 |
| 4.8.1 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SUCO GÁSTRICO - LIGADURA DO PILORO .....  | 20 |
| 4.8.2 DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE DE H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPASE.....                                    | 21 |
| 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 21 |
| 5. RESULTADOS .....   | 22 |
| 5.1 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL .....   | 22 |
| 5.2 ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO .....  | 25 |
| 5.3 MECANISMO ANTIÚLCERATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia gracilis</i> EM ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO .....          | 28 |
| 5.4 DETERMINAÇÃO DO MUCO NA PAREDE GÁSTRICA .....   | 30 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO SUCO GÁSTRICO</b>   | <b>31</b> |
| <b>5.6 AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. gracilis</i> SOBRE A ATIVIDADE DE H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPASE</b> | <b>32</b> |
| <b>6. DISCUSSÃO</b>  | <b>33</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO</b>  | <b>38</b> |
| <b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS</b>   | <b>38</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>39</b> |
| <b>ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA-UFS</b>  | <b>46</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica é uma doença crônica caracterizada por lesões profundas na parede gástrica, que adentram em toda a espessura da mucosa (TARNAWSKI, 2005; KANGWAN et al., 2014). Trata-se de uma doença que acomete grande parcela da população mundial, com prevalência de 2,4% na população ocidental e taxas de incidência anuais de 0,10% a 0,19% e alta taxa de cura; porém, com elevado índice de recorrência (KANGWAN et al., 2014; BI; MAN; MAN, 2014).

Este distúrbio ulcerativo surge quando se observa um significativo desequilíbrio entre os fatores agressores, endógenos e/ou exógenos [consumo abusivo de álcool, fumo, estresse, alimentação, uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, desregulação na secreção de pepsina e ácido gástrico], e protetores da mucosa [muco, bicarbonato, prostaglandinas, compostos sulfidrílicos, adequado fluxo sanguíneo, sistema antioxidante e óxido nítrico] (ROZZA; PELLIZZON, 2012; KANGWAN et al., 2014).

Na atualidade, várias classes de drogas são utilizadas no tratamento e/ou profilaxia da úlcera gástrica. As terapias farmacológicas baseiam-se no uso de inibidores da bomba de prótons (ex.: omeprazol, pantoprazol, lansoprazol), inibidores dos receptores H<sub>2</sub> de histamina (ex.: cimetidina, famotidina, nizatidina), antiácidos (ex.: hidróxido de alumínio ou magnésio), antibióticos para erradicação do *H. pylori* (ex.: claritromicina, amoxicilina) e drogas citoprotetoras da mucosa gástrica como análogos de prostaglandinas (ex.: misoprostol), carbenoxolona e sucralfato (NAJM, 2011; FOX; MUNIRAJ, 2016).

Apesar de promover melhora e/ou cura das úlceras gástricas, estes medicamentos podem apresentar efeitos adversos como diarreias, dores abdominais, arritmias, intolerância no trato gastrointestinal, entre outros. Estes fármacos agem estimulando os fatores protetores ou bloqueando os agressores, não existindo tratamentos que abordem de forma eficaz todos os componentes envolvidos (ROZZA; PELLIZZON, 2012; FOX; MUNIRAJ, 2016). O uso crônico de omeprazol, por exemplo, pode promover hipocloridria através da inibição total da secreção ácida e assim dificultar a absorção da vitamina B12 e magnésio, e está relacionado com o efeito rebote de hiperacidez gástrica e risco do desenvolvimento

de nefrite intersticial aguda e tumores carcinoides gástricos (BRADFORD; TAYLOR, 1999; ABRAHAM, 2012).

Consequentemente, este cenário tem motivado estudos à procura de novas drogas gastroprotetoras, com base em produtos naturais e seus compostos, as quais podem ser altamente eficazes no tratamento da úlcera, diminuir a recorrência das lesões, apresentar menos efeitos colaterais e ser de baixo custo (ROZZA; PELLIZZON, 2012; KANGWAN et al., 2014).

Nos últimos anos fica evidente o foco voltado para estudo de plantas medicinais e seus potenciais terapêuticos, considerando a ampla quantidade de estudos publicados sobre o tema nos últimos anos. Porém, vale ressaltar que o número de medicamentos provenientes dessas plantas ainda é inexpressivo, com poucas obtendo aprovação da agência reguladora brasileira ANVISA, sendo necessário esforço maior para estreitar a relação entre indústrias farmacêuticas e a academia, proporcionando à população os benefícios ao acesso dos mesmos (DUTRA et al, 2016).

Os produtos naturais são uma fonte rica de compostos bioativos com atividades farmacológicas promissoras, e têm sido as fontes de muitas substâncias com propriedades biológicas, por exemplo, atividades antioxidante e anti-inflamatória, úteis na medicina para o tratamento de distúrbios humanos diversos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Grande parcela da população mundial ainda deposita muita confiança nos produtos à base de plantas medicinais para tratar suas enfermidades, o que desperta o interesse no estudo dos efeitos dessas substâncias em vários países do mundo (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

Dentre os produtos naturais encontram-se os óleos essenciais, que são metabólitos secundários sintetizados em todas as partes de plantas aromáticas. Estes óleos essenciais apresentam-se na forma de líquidos voláteis compostos, solúveis em lipídios, com acentuado odor (ROZZA; PELLIZZON, 2012).

A *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), popularmente chamada de “alecrim-da-chapada” ou “alecrim-da-serra”, trata-se de uma erva comumente encontrada na vegetação do nordeste brasileiro. O óleo essencial desta espécie possui altas concentrações de monoterpenos, apresentando como componentes majoritários o timol, carvacrol, o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno e  $\beta$ -cariofileno (ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2008; MENDES et al., 2010; RIELLA et al., 2012). Em relação a esse óleo essencial são descritas na literatura atividades antinociceptiva, anti-inflamatória,

antioxidante e antimicrobiana, esta última contra a larva do *Aedes aegypti* (GUILHON et al., 2011; MENDES et al., 2010; SILVA et al., 2008). Entretanto, seu potencial efeito gastroprotetor ainda não foi investigado.

Partindo do pressuposto que existe um grande interesse econômico e científico na descoberta de novas substâncias ou terapias alternativas para o tratamento de úlceras gástricas, aliado as atividades biológicas apresentadas pelo óleo essencial da *Lippia gracilis*, torna-se importante avaliar seu efeito gastroprotetor.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ÚLCERA GÁSTRICA

A úlcera gástrica é compreendida como uma doença crônica, com possibilidade de complicações inesperadas, envolvendo sangramentos, estenose e perfurações na mucosa, relacionadas a altos níveis de secreção de ácido gástrico e comprometimento dos mecanismos de defesa (; KANGWAN et al., 2014; HUNT et al., 2015).

O desenvolvimento da úlcera é basicamente o resultado de um desequilíbrio entre mecanismos protetores da mucosa [muco, bicarbonato, prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO), compostos sulfidrílicos (SH) não proteicos, sistema antioxidante e fluxo sanguíneo mucoso] e fatores danosos [aumento da secreção de ácido gástrico e pepsina, infecção pelo agente bacteriano *Helicobacter pylori*, uso prolongado de AINEs, alimentação inadequada, tabagismo e consumo exagerado de álcool] (ROZZA; PELLIZZON, 2012; KANGWAN et al., 2014; BI; MAN; MAN, 2014).

A úlcera segue como uma das doenças de maior prevalência no mundo, com mais de 300.000 casos diagnosticados por ano nos EUA, acarretando custos na casa dos bilhões de dólares. Na Coreia do Sul em 2005, 20% dos adultos que se dirigiam ao hospital universitário relatavam sofrer de úlcera, e sua incidência aparenta estar aumentando em idosos, tornando um fator de risco para mortalidade (OVERMIER; MURISON, 2012; LEONTIADIS et al., 2013). Estima-se no Brasil uma taxa de prevalência da úlcera de 0,2% para homens e 0,1% para mulheres, com mortalidade de 3,0/100 mil habitante (OLIVEIRA et al., 2015)

A prevalência de úlcera relacionada ao *H. pylori* vem diminuindo; no entanto, os casos de úlcera associados ao uso de AINEs vem aumentando conjuntamente com uma incidência mais alta em fumantes e/ou consumidores de álcool em demasia (BI; MAN; MAN, 2014; CARLI et al., 2015). No estômago, o álcool pode promover danos à mucosa, influenciando maior secreção de ácido, estimulando as células parietais através do sistema colinérgico, com maior produção de AMPc e liberação de histamina, gerando a úlcera (BUJANDA, 2000).

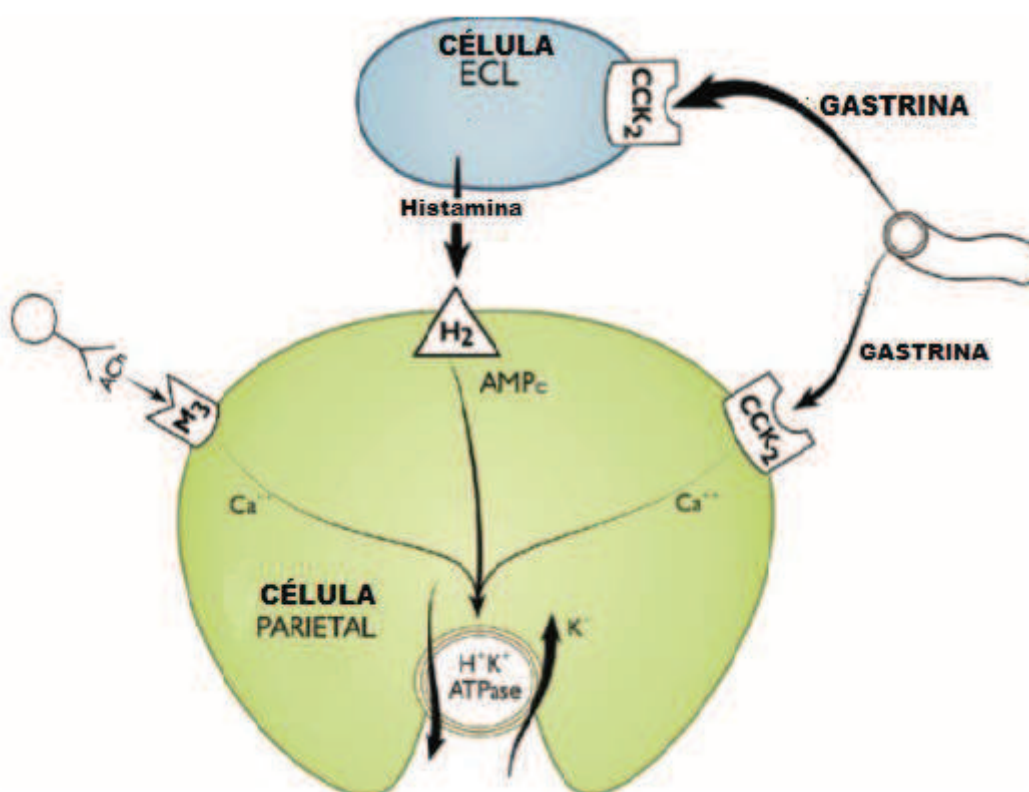
## 2.2 FISILOGIA GÁSTRICA

O estômago trata-se de um reservatório ativo encarregado de armazenar, triturar e dispensar os alimentos parcialmente digeridos para o intestino, para que seja realizada a digestão e absorção dos nutrientes. Este órgão é responsável pela secreção do ácido clorídrico (HCl), que vai converter o pepsinogênio em pepsina, auxiliando a digestão de proteínas, a absorção de ferro, cálcio e vitamina B12, e ainda prevenir contra o crescimento bacteriano (CHU; SCHUBERT, 2012).

Anatomicamente o estômago é dividido em três regiões (fundo, corpo e piloro) e, funcionalmente, existem duas regiões glandulares: mucosa oxíntica e pilórica. A mucosa da glândula oxíntica, marcada principalmente pela célula parietal, compreende 80% do fundo e do corpo. A mucosa da glândula pilórica compreende 20% do antro (DI MARIO; GONI, 2014). As células dominantes da mucosa oxíntica são as células parietais (secretores de ácido) e células tipo-enterocromafins (secretores de histamina). Dentre outros tipos celulares, encontram-se as células enterocromafins (produtoras de peptídeo natriurético atrial, serotonina e adrenomedulina) e células D (produtoras de somatostatina). A característica distintiva da mucosa pilórica é a célula G (produtora de gastrina) (CHU; SCHUBERT, 2012; DI MARIO; GONI, 2014).

A modulação da secreção de ácido para suprir a demanda fisiológica se dá por mecanismos neurais, hormonais e parácrinos. Seus principais estimulantes são a histamina, a gastrina e a acetilcolina (figura 1) (SCHUBERT; PEURA, 2008). O sistema nervoso central (SNC) modula o sistema nervoso entérico mediante a acetilcolina (ACh) que estimula a secreção de ácido gástrico pelas entradas sensoriais impulsionadas pelo pensamento, visão, olfato, paladar e deglutição de alimentos. A regulação periférica ocorre através de uma variedade de estímulos hormonais, parácrinos, endócrinos, bem como produtos químicos (SCHUBERT, 2014).





**Figura 1.** Esquema ilustrando a regulação da secreção de ácido gástrico por mecanismos neurais (acetilcolina), hormonais (gastrina) e parácrinos (histamina). Adaptado de SCHUBERT; PEURA (2008). Ach = acetilcolina; AMPc = adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; CCK<sub>2</sub> = receptores de colecistocinina 2; M<sub>3</sub> = receptor muscarínico 3; H<sub>2</sub> = receptor de histamina 2.

A Ach estimula diretamente a secreção de ácido gástrico através da ativação dos receptores muscarínicos (M<sub>3</sub>) nas células parietais, e, indiretamente, por meio da ativação dos receptores M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub> nas células D, inibindo a secreção de somatostatina. A histamina estimula diretamente a célula parietal por meio de ligação aos receptores H<sub>2</sub> e, indiretamente, através dos receptores H<sub>3</sub>, inibindo a somatostatina e, consequentemente, favorecendo a histamina e secreção ácida. A gastrina, hormônio liberado em resposta aos alimentos, estimula a secreção de ácido gástrico via receptor de colecistocinina (CCK-2) nas células tipo-enterocromafins, liberando histamina. (SCHUBERT; PEURA, 2008; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

A Ach, liberada pelo nervo vago, estimula a secreção ácida mediante ligação aos receptores M<sub>3</sub> na célula parietal por meio do aumento do cálcio intracelular. Esses receptores são acoplados a fosfolipase C que gera trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) por quebra de fosfolípídeos de membrana. O IP3 provoca a

liberação de cálcio dos depósitos intracelulares que, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC), levando a uma nova cascata de fosforilação de proteínas envolvidas na ativação da bomba de  $H^+K^+ATPase$  (YAO; FORTE, 2003; SCHUBERT; PEURA, 2008).

A pelas células G quando estimuladas pela ingestão de alimentos contendo proteína liberam o hormônio gastrina, que estimula indiretamente a secreção de ácido gástrico, através do receptor de colecistocinina (CCK)-2, um receptor acoplado a proteína Gq, presentes principalmente nas ECL responsáveis por sintetizar e liberar histamina. A gastrina promove essa liberação de histamina pelas células ECL por aumento do  $IP^3$ , conseguinte elevação do cálcio intracelular e estimulação de diversos fatores relacionados a produção e liberação da histamina (PRINZ; ZANNER; GRATZL, 2003; CHU; SCHUBERT, 2012)

A histamina, por sua vez, ao ativar receptores  $H_2$  aumentam o adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, ativando a proteína kinase A (PKA). A PKA começa uma cascata de fosforilação e ativação de proteínas também envolvidas na atividade da de  $H^+K^+ATPase$  (YAO; FORTE, 2003, SCHUBERT; PEURA, 2008).

A somatostatina, secretada pelas células D, atua inibindo a secreção de ácido gástrico de forma direta na célula parietal via receptores de somatostatina ( $ST_2$ ) e indireta por inibição da secreção de histamina das células ECL e através da inibição da secreção de gastrina pelas células G. Sua liberação ocorre quando o pH do lúmen estomacal está abaixo de 3 (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Quando estimulada a secreção ácida, a bomba de prótons das células parietais,  $H^+K^+ATPase$ , que se encontram em vesículas tubulares intracelulares é translocada e se funde à membrana apical, liberando o  $H^+$  em troca de  $K^+$  contra o gradiente de concentração. Quando finalizada a secreção, a enzima é inativada e volta a ser internalizada na célula parietal (SCHUBERT, 2011).

## 2.3 GASTROPROTEÇÃO

A mucosa gástrica está constantemente exposta a diversos fatores exógenos, como os próprios alimentos possuidores de substâncias que podem provocar o desenvolvimento de úlceras gástricas (MAGIEROWSKI et al., 2015a). Entretanto, para preservar sua integridade, a mucosa faz uso de mecanismos de defesa, que compreendem fatores pré-epiteliais, uma barreira epitelial, envolvendo a produção de muco e bicarbonato, PGs, grupamentos SH, fluxo sanguíneo constante, NO e sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; MAGIEROWSKI et al., 2015a;).

A camada constituída por muco, bicarbonato e fosfolipídios surfactantes mostra-se como a primeira linha de defesa da mucosa (ALLEN; FLEMSTRÖN, 2005). O muco gástrico secretado pelas células epiteliais superficiais é um gel composto de 95% de água e 5% de glicoproteínas, que forma uma camada envolvendo toda a superfície da mucosa. Esta camada não agitada utiliza o bicarbonato para que se mantenha um pH próximo da neutralidade, evitando a invasão da pepsina, e assim protegendo da autodigestão (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). O muco também exerce função como lubrificante, para minimizar danos físicos ao epitélio provenientes de materiais ingeridos, assim como a possibilidade do contato com bactérias (WALLACE, 2008). Os mecanismos regulatórios da secreção de  $HCO_3^-$  da mucosa compreendem fatores neurais, humorais e concentração de ácido luminal, com participações relevantes das PGs (aumento de  $AMPc$ ) e do NO (aumento de  $GMPc$ ) na modulação local desta secreção, (TAKEUCHI et al, 2011).

As PGs são produzidas a partir do metabolismo do ácido araquidônico produzido pelo estômago e duodeno através das enzimas ciclo-oxigenases (COX), sendo a COX-1 mais envolvida nas respostas gástricas. A prostaglandina da série E e a prostaciclina ( $PGI_2$ ) são potentes vasodilatadores, produzindo este efeito no estômago via receptores EP2/EP4 e IP (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; GYIRES; TOTH; ZADORI, 2015).

As PGs podem regular diversos fatores na mucosa gástrica. Via receptores EP3 pode inibir diretamente a secreção de HCl pelas células parietais e, indiretamente, a liberação de histamina pelas células tipo-enterocromafins, e por

meio dos receptores EP1 e EP4 aumentam a secreção de muco e bicarbonato. Quando a PGE<sub>2</sub> se liga aos receptores EP2 e EP4, aumenta o fluxo sanguíneo da mucosa. Os receptores EP1 também afetam a motilidade gástrica e com isso promovem maior proteção frente às lesões. (TAKEUCHI, 2014; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

A via de sinalização envolvida na ação das PGE<sub>2</sub> vai depender dos receptores EP ao qual ela se liga, considerando que são mediados por diferentes proteínas que utilizam distintos segundos mensageiros. Os receptores EP1 são acoplados a proteína Gq, resultando no aumento do  $Ca^{++}$  intracelular. Receptores EP2 e EP4 estão acoplados a proteína Gs, ativando a adenilato ciclase e elevando os níveis de AMPc. Porém reduz o AMPc caso se ligue aos receptores EP3, acoplados a proteína Gi (DEY; LEJEUNE; CHADEE, 2006).

Acredita-se que o efeito protetor das PGs na mucosa gástrica envolve a ativação de canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP (K<sub>ATP</sub>) pela ativação da proteína quinase A (PKA) (EUGUCHI et al., 2007). Como sugere os resultados do estudo de PESKAR, EHRLICH, PESKAR (2002), onde o bloqueio desses canais por glibenclamida promoveu redução da proteção de um análogo de prostaglandina e outros agentes protetores, porém quando administrado o cromacalim, ativador dos canais de potássio o efeito protetor dos compostos foi preservado. MEDEIROS et al. (2008) observaram o envolvimento da ativação de canais K<sub>ATP</sub> na proteção gástrica do sildenafil, que eleva os níveis de GMPc, contra a lesão induzida por etanol, enquanto Gomes et al. (2006) descreveram a participação dos canais K<sub>ATP</sub> no efeito gastroprotetor do lipopolissacarídeo contra a lesão induzida por indometacina.

O NO assume uma papel fundamental na defesa da mucosa gástrica pelo aumento do fluxo sanguíneo e manutenção da microcirculação na mucosa gástrica (GYIRES; TOTH; ZADORI, 2015). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, pela ação da enzima sintase do NO (NOS) , nas isoformas constitutiva (NOSc) ou induzível (NOSi), esta última em resposta a processos danosos. O NO se difunde do endotélio para os músculos lisos onde reage com a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), levando a formação do segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Este GMPc vai ativar a proteína quinase G iniciando uma cascata de fosforilação resultando no relaxamento do músculo liso, seguido do aumento do diâmetro do vaso e do fluxo sanguíneo na região (MAGIEROWSKI et al., 2015a).

Quando a mucosa gástrica está exposta a fatores agressores, a NOS endotelial é ativada e o NO produzido, o qual desempenha um papel importante em relação ao processo de cicatrização da úlcera via modulação da microcirculação e aumento do fluxo sanguíneo necessário para a mucosa (EL-DEMERDASH et al., 2010).

O  $H_2S$ , de forma semelhante ao NO, é um mediador gasoso com importância na proteção da mucosa gástrica. Este mediador é sintetizado a partir da L-cisteína pela atividade de duas enzimas dependentes do piridoxal-5-fosfato (vitamina B6): a cistationina  $\gamma$ -liase e a cistationina  $\beta$ -sintase. Seu efeito gastroprotetor dá-se por vários mecanismos, como aumento do fluxo sanguíneo e da secreção de bicarbonato, aumento da síntese de PGs, menor adesão endotelial de leucócitos, diminuição de espécies reativas do oxigênio e diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (GYIRES; TOTH; ZADORI, 2015; MAGIEROWSKI et al., 2015b). O  $H_2S$  desempenha um papel importante quando o tecido encontra-se ulcerado, considerando que o processo de cicatrização é parcialmente dependente da sua participação, acelerando a cura (GEMICI; WALLACE, 2015).

Os compostos SH endógenos desempenham um importante papel na proteção da mucosa gástrica; com sua ação antioxidante, se liga aos radicais livres formados pela ação do agente nocivo e atua na produção de muco. A glutathiona reduzida (GSH), uma representante do grupo sulfidrílico não proteico, ilustra essa participação de defesa aos danos oxidativos na lesão, GSH se liga aos radicais livres e se apresenta em níveis mais baixos em tecidos ulcerados de ratos (ROZZA; PELLIZZON, 2012).

Os adrenoceptores desempenham papel considerável sobre a regulação pré-sináptica de liberação do transmissor e, influenciando assim na modulação de funções do trato gastrointestinal (ZÁDORI et. al, 2011). Na complexa regulação neural da secreção gástrica, os  $\alpha_2$ -adrenoceptores, distribuídos largamente no trato gastrointestinal, quando ativados podem inibir a produção de ácido gástrico, motilidade e evitar danos à mucosa gástrica (SHUJAA et al., 2011).

## 2.4 TERAPÊUTICA ATUAL

No século XX a úlcera gástrica era tratada com cirurgia, a vagotomia, onde era feito a secção do nervo vago. Quadro este que mudou com o surgimento da terapia farmacologica na década de 70 e a descoberta dos receptores de histamina nas células parietais, implicando no surgimento da cimetidina, um bloqueador do receptor H<sub>2</sub>. Em seguida foi descoberta a bomba de prótons e surgiu o omeprazol como fármaco inibidor desta bomba. Posteriormente, tivemos a descoberta da bactéria *H. pylori* e a comprovação de seu envolvimento na úlcera gástrica (TONETO; OLIVEIRA; LOPES, 2011).

Atualmente as drogas usadas no tratamento de úlceras gástricas incluem antibióticos nos casos de infecção por *H. pylori* (ex.: claritromicina, amoxicilina), antagonistas de receptores H<sub>2</sub> da histamina (ex.: ranitidina cimetidina, famotidina, nizatidina), inibidores da bomba de prótons (ex.: omeprazol, lansoprazol) e, mais recentemente, drogas citoprotetoras como análogos de PGs (ex.: misoprostol), sucralfato e carbenoxolona (NAJM, 2011; FOX; MUNIRAJ, 2016).

Vale ressaltar que algumas estratégias terapêuticas baseiam-se no uso de dois ou mais fármacos de classes diferentes, que promovem o tratamento abordando os vários mecanismos da doença. Todas as drogas utilizadas podem apresentar efeitos adversos como arritmias, diarreia, intolerância gastrointestinal, entre outros (TUSKEY; PEURA, 2013; FOX; MUNIRAJ, 2016).

O uso por tempo prolongado de inibidores da bomba de prótons pode ocasionar diversos riscos a saúde, considerando que a supressão da secreção ácida acaba interferindo na absorção de vitaminas e nutrientes importantes para o adequado funcionamento do organismo, como vitamina B<sub>12</sub>, magnésio e cálcio, e assim aumentando as possibilidades de desenvolvimento de processos infecciosos, inflamatórios e até mesmo fraturas ósseas (ITO; JENSEN, 2010; CORLETO et. al, 2016).

Portanto, torna-se evidente a necessidade da pesquisa de novas substâncias com potencial para tratar a úlcera gástrica de forma ampla, abrangendo o máximo de fatores envolvidos, com menor ou nenhum efeito adverso e a baixo custo.

## 2.5 *Lippia gracilis*

Desde o começo dos tempos o homem explora a natureza em busca de subsídios que lhe proporcionem maiores chances de sobrevivência. Neste cenário, o emprego de plantas medicinais para a manutenção da saúde se dá de maneira relevante, sendo utilizadas preparações para uso local até o desenvolvimento de drogas cada vez mais refinadas (GIRALDI; HANAZAKI, 2010). As plantas e diversos produtos naturais estão sendo bastante estudados ao redor do mundo quanto a suas potenciais ações biológicas e potencial uso terapêutico para tratamento de diversas doenças, como câncer, doença de Chagas e Malária (CHRISTEN; CUENDET, 2012).

A pesquisa e uso de plantas medicinais e fitoterápicos para o tratamento de diversas doenças vêm sendo atualmente muito estimulado pelo governo. O SUS desde 2007 tem disponibilizado para os pacientes, por meio das secretarias de saúde nas esferas estadual e municipal, medicamentos fitoterápicos para o tratamento de diversas doenças, como a *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa), empregada no tratamento de úlceras e gastrites, e a *Mikania glomerata* (Guaco), para tratar sintomas da gripe (Brasil, 2012). A partir de 2008 foi colocado em vigor o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com aprovação do Governo Federal, que visa garantir que a população tenha acesso e desfrute de forma segura dos benefícios das plantas medicinais e fitoterápicos, com investimento na obtenção de máquinas e acessórios, admissão de técnicos capacitados proporcionando uma associação entre todos os pilares envolvidos no processo de produção a distribuição destes medicamentos (Brasil, 2012).

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) é composto por cerca de 200 espécies distribuídas pelos países das Américas do Sul e Central e África Tropical. Grande parte deste gênero é popularmente utilizada para tratar distúrbios gastrointestinais e respiratórios. Algumas espécies de *Lippia* já possuem suas atividades antimalárica, antiviral e citostática comprovadas (PASCUAL et al., 2001a), entre outras. A literatura relata que a *Lippia dulcis* possui atividade anti-inflamatória (PEREZ et al., 2005), a *Lippia sidoides* Cham possui atividade antimicrobiana (VERAS et al., 2014) e a *Lippia citriodora* possui atividade anticonvulsivante (RASHIDIAN et al., 2016).

A *Lippia gracilis* Schauer (fig. 2) , popularmente chamada de “alecrim-da-chapada” ou “alecrim-da-serra” é uma erva comumente encontrada na vegetação do

nordeste brasileiro, utilizada popularmente para tratar sinusite, bronquite, congestão nasal e dor (ALBUQUERQUE et al., 2007). Esta espécie produz um óleo essencial (OE) contendo como componentes majoritários timol, carvacrol, o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno e  $\beta$ -cariofileno (ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2008; MENDES et al., 2010; RIELLA et al., 2012), usado externamente pela população para tratar dores abdominais, doenças cutâneas, queimaduras, feridas e úlceras, conforme revisado por Pascual et al. (2001a).



**Figura 2.** *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae)

A atividade antimicrobiana do OE da *L. gracilis* foi descrita por SILVA et al. (2008), sendo capaz de provocar elevada mortalidade em larvas do *Aedes aegypti*. Em 2010 MENDES et al. avaliaram os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do OE da *L. gracilis*, observaram que ele foi eficiente na redução do edema induzido por injeção de carragenina entre a primeira e quarta hora após a injeção em ratos, também diminuiu a migração leucocitária para a região peritoneal de camundongos após uma hora da injeção de carragenina e o OE foi capaz de inibir as contorções



abdominais provocadas por ácido acético. Foi avaliada também a atividade antioxidante in vitro, na qual o OE apresentou potencial antioxidante moderado.

Em 2011 GUILHON et al. buscaram caracterizar as atividades descritas anteriormente do OE e avaliar possíveis mecanismos envolvidos. Os resultados indicaram que o OE da *L. gracilis* pode inibir respostas inflamatórias bloqueando a via do NO e também pode atenuar a hipernocicepção por bloqueio dos sistemas opióide e colinérgico. Ainda nesse estudo foi feita uma avaliação da toxicidade aguda, onde os animais foram tratados com o OE observados para análise de parâmetros comportamentais e posteriormente os estômagos coletados para análise da integridade da mucosa, e a administração oral OE a 500mg/kg de dose não induziu qualquer efeito tóxico, não provocou alterações comportamentais, lesões ou sangramento gástrico.

Em relação a atividade gastroprotetora, a literatura relata que algumas espécies da *Lippia*, como *L. sidóides* e *L. alba*, possuem capacidade de diminuir as úlceras gástricas induzidas por diferentes agentes (PASCUAL et al., 2001b; MONTEIRO et al., 2007). Entretanto, não encontramos relato da possível ação gastroprotetora da *L. gracilis*,

Considerando a constituição química do OE de *L. gracilis*, as atividades biológicas apresentadas e o incentivo de políticas públicas para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos a base de plantas medicinais, torna-se apropriado avaliar seu possível efeito gastroprotetor.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito gastroprotetor do óleo essencial da *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) em úlcera aguda experimental e alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito gastroprotetor do óleo essencial da *Lippia gracilis*, macro- e microscopicamente, em úlceras agudas.

Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do óleo essencial da *Lippia gracilis* em úlceras agudas.

Avaliar efeito do óleo essencial da *Lippia gracilis* sobre as secreções de ácido gástrico e muco após ligadura de piloro.

Determinar *in vitro* o efeito do óleo essencial da *Lippia gracilis* sobre a atividade de H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PLANTA

A *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) foi cultivada na Estação Experimental "Campus Rural", da Universidade Federal de Sergipe, no município de São Cristóvão, Sergipe (10°55'32" S, 37°06'08" O) e suas folhas foram coletadas em fevereiro de 2008. A planta foi autenticada pela professora Ana Paula Prata, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe e um espécie voucher foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (Av. Marechal Rondon S/N, São Cristóvão-SE, 49100-000, Brasil, sob o nº ASE 9206). Antes da extração, as folhas foram secas a 40 °C em forno de ar forçado (Marconi MA 037) durante 5 dias.

### 4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração foi realizada no Laboratório de Fitotecnia, Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Sergipe. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger durante 4 h, usando 100 g de folhas secas. O óleo essencial (OE) obtido foi separado da fase aquosa e mantido no congelador até posterior análise.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO

As análises de cromatografia (CG) foram realizadas, em parceria com o professor Dr. Péricles Barreto Alves no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, utilizando um CG-MS/FID (QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas usando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (polissiloxano com 5% de difenil- - 95% de dimetil) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.), 0,25 µm de espessura de filme, em um fluxo constante de hélio (99,999%) com taxa de escoamento de 1,2 mL/min. Foi utilizado um volume de injeção de 0,5 µL (5 mg/mL), com uma razão de divisão de 1:10. A

temperatura do forno foi programada com 50°C (isotérmica durante 1,5 min), com um aumento de 4 °C/min à 200°C, em seguida a 10 °C/min até 250°C, terminando com uma isotérmica de 5 min a 250°C. Os dados MS e FID foram simultaneamente adquiridos empregando um sistema detector de separação; a razão de escoamento de separação foi de 4:1 (MS:FID). Um tubo restritor de 0,62 m × 0,15 milímetros de d.i. (coluna capilar) foi utilizado para conectar o divisor ao detector MS; um tubo restritor de 0,74 m × 0,22 milímetros de d.i. foi utilizado para conectar o divisor ao detector FID. Os dados de MS (cromatograma iônico total, TIC) foram adquiridos no modo de varredura completa (m/z de 40-350) a uma taxa de varredura de 0,3 varredura/s usando o EI com uma energia eletrônica de 70 eV. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram de 250°C. A temperatura do FID foi ajustada para 250°C, e o fornecimento de gás para o FID foram hidrogênio, ar e hélio em taxas de fluxo de 30, 300 e 30 mL/min, respectivamente. A quantificação de cada componente foi estimada por normalização da área de pico gerada (%) no FID. As concentrações de compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos de CG e foram dispostas em ordem de eluição de CG.

A identificação dos componentes individuais do óleo essencial foi realizada com base nos índices de retenção para uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C19) com os descritos na literatura (ADAMS, 2007), bem como pela correspondência computadorizada do espectro de massa adquirido com aquelas armazenadas nas bibliotecas do equipamento (NIST21, NIST107 e WILEY8).

#### 4.4 DROGAS

Azul de Alcian, carbenoxolona, cimetidina, *N*-etilmaleimida (NEM), ioimbina, ouabaína, glibenclamida, indometacina, *Nw*-nitro-*L*-arginina cloridrato do éster metílico (L-NAME) e omeprazol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. As doses escolhidos do OE de *L. gracilis* foram baseadas em experimentos preliminares de nosso grupo de pesquisa.

## 4.5 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss (28-32 g) e ratos Wistar (200-250 g), de ambos os sexos, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Brasil). Os animais foram mantidos à temperatura ambiente controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com livre acesso a ração (Purina®) e água, sob um ciclo claro/escuro de 12:12 h. Os experimentos foram realizados após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética Institucional (CEPA/UFS 41/2016) e foram realizadas de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório. Um coelho albino adulto (*Oryctolagus cuniculus*), pesando aproximadamente 2 kg foi utilizado para o ensaio de atividade da  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase gástrica.

## 4.6 ATIVIDADE ANTIULCERATIVA

### 4.6.1 ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO

O experimento foi realizado de acordo com o método de MIZUI; DOTEUCHI (1983) com algumas modificações (RIBEIRO et al., 2016b). Após 16 horas de jejum, os camundongos ( $n = 8/\text{grupo}$ ) foram tratados por via oral (v.o.) com o OE (20, 60 e 180 mg/kg), omeprazol (30 mg/kg) ou veículo (0,2% de Tween 80 em água destilada, 10 mL/kg). Quarenta e cinco minutos após o tratamento, todos os animais receberam 10 mL/kg de etanol a 60%/HCl a 0,3 mmol/L para indução da úlcera gástrica. Uma hora mais tarde, os animais foram anestesiados (algodão embebido com halotano) e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Os estômagos foram removidos, abertos ao longo da curvatura maior, cuidadosamente lavados com água, para remover os conteúdos gástricos e coágulos de sangue, e subsequentemente escaneados. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software IMAGE J. Os resultados foram expressos como área total de lesão ( $\text{mm}^2$ ) e/ou área relativa de lesão (área ulcerativa total em relação à área total de cada estômago, %).

Para a análise histológica, as amostras dos estômagos foram fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina. As amostras (OE nas doses de 20, 60 e 180 mg/kg, omeprazol e veículo) foram cortadas de forma seriada em seções de 5  $\mu\text{m}$  de espessura e coradas em hematoxilina-eosina (HE). Uma pontuação

microscópica foi determinada para os seguintes parâmetros: (i) ruptura da região superficial da glândula gástrica com perda de células epiteliais e (ii) edema intersticial. A intensidade da perda de células epiteliais e do edema intersticial foi avaliada como se segue, para cada critério: 0 - ausência; 1 - focal, limitado ao terço superior; 2 - focal, para além do terço superior; e 3 - difuso, no terço superior. As seções foram avaliadas por um patologista experimentado sem conhecimento prévio dos tratamentos (quatro seções histológicas/animal, n = 8/grupo).

#### 4.6.2 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* EM ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO

Em outro conjunto de experimentos, os animais (n = 8/grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com: (i) um antagonista de adrenorreceptor- $\alpha_2$ , ioimbina (2 mg/kg) (BALOGUN; DAMAZO; de OLIVEIRA MARTINS, 2015); (ii) um bloqueador de compostos SH, N-etilmaleimida (NEM; 10 mg/kg) (BATISTA et al., 2015); (iii) um inibidor não-seletivo da NOS, Nw-nitro-L-arginina cloridrato do éster metílico (L-NAME; 10 mg/kg) (BALOGUN; DAMAZO; de OLIVEIRA MARTINS, 2015); (iv) um anti-inflamatório não-esteroidal que inibe a síntese de PGE<sub>2</sub>, indometacina (10 mg/kg) (BALOGUN; DAMAZO; de OLIVEIRA MARTINS, 2015); (v) um bloqueador de canais de K<sub>ATP</sub>, glibenclamida (10 mg/kg) (SILVA et al, 2009); ou (vi) veículo (10 mL/kg). Todas as substâncias foram dissolvidas em 0,2% de Tween 80 em solução salina a 0,9%, com exceção da indometacina que foi dissolvida em bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) a 5% em solução salina a 0,9%. Após 45 min, os animais receberam o OE (180 mg/kg; v.o.) ou veículo (0,2% de Tween 80 em água destilada; 10 mL/kg; v.o.). Quarenta e cinco minutos mais tarde, a lesão gástrica foi induzida por instilação intragástrica de etanol/HCl (10 mL/kg; v.o.). A área total da lesão foi determinada após 1 hora, como descrito acima.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO MUCO NA PAREDE GÁSTRICA

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia previamente descrita por SUN; MATSUMOTO; YAMADA (1991) com algumas modificações (RIBEIRO et al., 2016b). Após 24 horas de jejum, os ratos foram anestesiados com inalação de isoflurano (1,5%, gerado por um vaporizador calibrado), realizada uma incisão

abdominal e o piloro ligado. Imediatamente após ligadura do piloro, os animais (n = 8/grupo) foram tratados por via intraduodenal com o OE (20, 60 e 180 mg/kg), carbenoxolona (200 mg/kg) ou veículo (0,2% de Tween 80 em solução salina a 0,9%; 10 mL/kg) e suturados. Após 4 horas dos tratamentos os animais foram anestesiados (algodão embebido com halotano) e submetidos à eutanásia por exsanguinamento. O estômago foi imerso em 10 mL de azul de Alcian a 0,02%, sacarose a 0,16 mmol/L, solução de acetato de sódio a 0,05 mmol/L (pH 5,8) e incubado durante 24 h a 25°C. O extrato de ligação com azul de Alcian foi centrifugado a 3000×g durante 10 min. A absorbância do sobrenadante foi medida através de espectrofotometria a 620 nm. O muco livre no conteúdo gástrico foi calculado a partir da quantidade de azul de Alcian ligado (mg/g de tecido).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTISSECRETORES

##### 4.8.1 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SUCO GÁSTRICO - LIGADURA DO PILORO

O ensaio foi realizado usando o método de SHAY et al. (1945), com algumas modificações (RIBEIRO et al., 2016b). Após 24 horas de jejum, os ratos foram anestesiados com inalação de isoflurano (1,5%, gerado por um vaporizador calibrado), feita uma incisão abdominal e o piloro ligado. Imediatamente após a ligadura do piloro, os animais (n = 8/grupo) foram tratados por via intraduodenal com o OE (20-180 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (0,2% de Tween 80 em solução salina a 0,9%; 10 mL/kg) e suturados. Quatro horas mais tarde, os animais foram anestesiados (algodão embebido com halotano) e eutanasiados por exsanguinamento. O abdômen foi aberto, os estômagos removidos e o conteúdo gástrico recolhido, após adição de 3 mL de água destilada para lavagem estomacal, e centrifugado a 3000 rpm (8000×g, 25°C, 10 min). Determinou-se a quantidade de ácido no suco gástrico (mL) e os valores de pH. A secreção ácida total no sobrenadante do suco gástrico foi determinada por titulação como pH 7,0, utilizando uma solução de NaOH a 0,01 mmol/L e fenolftaleína como indicador.

#### 4.8.2 DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE $H^+,K^+$ -ATPASE

O experimento foi desenvolvido em colaboração com a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), São José-SC. O homogenato preparado a partir da mucosa gástrica de coelho foi utilizado para isolar microssomas gástricos. Tal como descrito por KUBO et al. (1995), a enzima  $H^+,K^+$ -ATPase gástrica em microssomas foi obtida por ultracentrifugação e gradiente de separação. Posteriormente, a mistura reacional contendo 50  $\mu$ L de tampão Tris-HCl a 50 mmol/L (pH 7,4), KCl a 20 mmol/L,  $MgCl_2$  a 2,5 mmol/L, ATP a 1 mmol/L foi adicionada a 100  $\mu$ g da preparação de  $H^+,K^+$ -ATPase e incubada a 37°C durante 20 min, na ausência ou presença de veículo (0,5% de DMSO em água), OE de *L. gracilis* (1-300  $\mu$ g/mL), omeprazol (100  $\mu$ g/mL) ou ouabaína (100  $\mu$ g/mL), este último utilizado para comprovar a especificidade da atividade da  $H^+,K^+$ -ATPase gástrica. O omeprazol foi incubado em tampão Tris-HCl a 50 mmol/L (pH 5,5) até à sua protonação. Parou-se a reação por adição de 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 50%gelado. A atividade da ATPase foi quantificada através da medição do fosfato inorgânico ( $P_i$ ) liberado da hidrólise do ATP (FISKE; SUBBAROW, 1925). Os experimentos foram realizados em triplicata e a atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de  $P_i$  ( $\epsilon$  = 11.000/mmol/L/cm) e expressa em micromolares de  $P_i$  por miligrama de proteína por minuto.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como as médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. Foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov, com valor de  $P > 0,10$ . A análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida pelo teste de Bonferroni foi utilizada para os dados paramétricos e para os dados não-paramétricos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Valores de  $P$  inferiores a 0,05 foram considerados significativos.



## 5. RESULTADOS

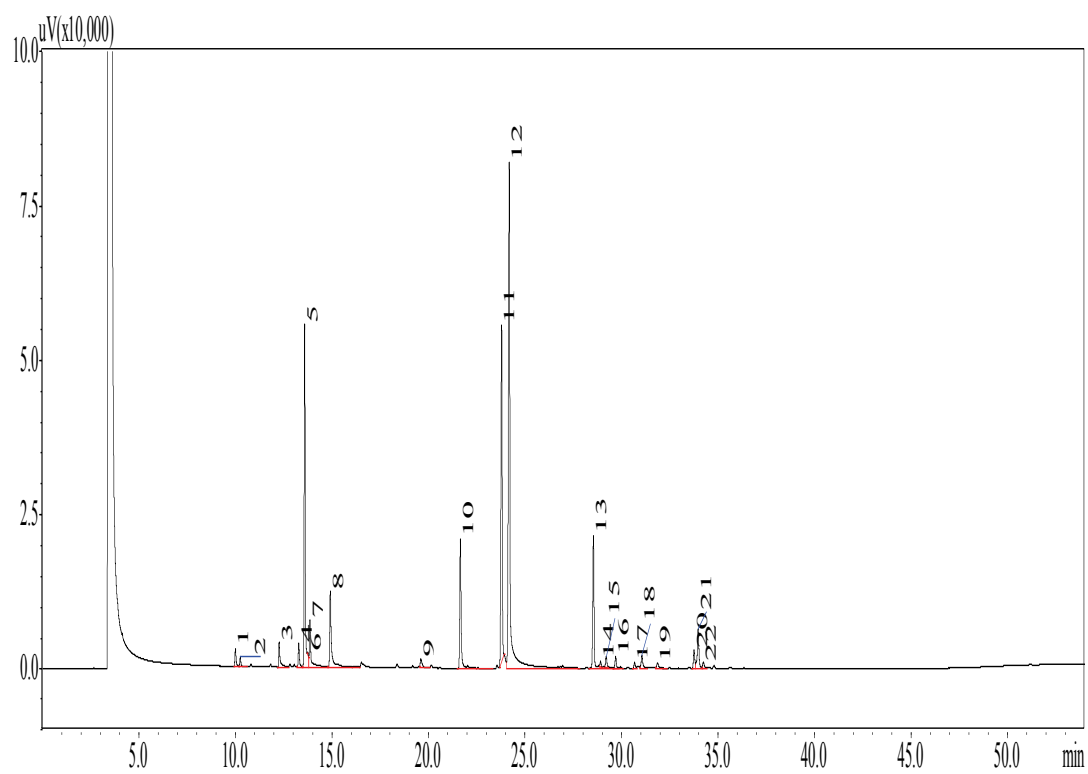
### 5.1 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de folhas de *Lippia gracilis* foi obtido com 1,5% de rendimento. Foram identificados vinte e um compostos, representando 99,58% do OE; seus índices de retenção e percentual são apresentados na Tabela 1. Os principais componentes identificados no OE de *Lippia gracilis*, de acordo com seus índices de retenção (ADAMS, 2007) foram: carvacrol (34,72%), timol (16,08%), *p*-cimeno (15,06%), éter metílico de timol (7,18%), (E)-cariofileno (6,86%) e  $\gamma$ -terpineno (5,07%). Adicionalmente, um cromatograma representativo do óleo essencial de folhas de *Lippia gracilis* é mostrado na Fig. 3.

**Tabela 1.** Composição de óleo essencial das folhas de *Lippia gracilis*.

| Pico               | RRI exp. | RRI lit. | Composto                    | CG-FID (%) |
|--------------------|----------|----------|-----------------------------|------------|
| 1                  | 929      | 924      | $\alpha$ -Tujeno            | 0,81       |
| 2                  | 937      | 932      | $\alpha$ -Pineno            | 0,38       |
| 3                  | 994      | 988      | Mirceno                     | 1,48       |
| 4                  | 1015     | 1014     | $\alpha$ -Terpineno         | 1,07       |
| 5                  | 1021     | 1020     | p-Cimeno                    | 15,06      |
| 6                  | 1024     | 1022     | $\alpha$ -Cimeno            | 0,09       |
| 7                  | 1026     | 1026     | 1,8-Cineol                  | 3,04       |
| 8                  | 1052     | 1054     | $\gamma$ -Terpineno         | 5,07       |
| 9                  | 1172     | 1174     | Terpinen-4-ol               | 0,72       |
| 10                 | 1227     | 1232     | Timol metil éter            | 7,18       |
| 11                 | 1287     | 1289     | Timol                       | 16,08      |
| 12                 | 1298     | 1298     | Carvacrol                   | 34,72      |
| 13                 | 1417     | 1417     | (E)Cariofileno              | 6,86       |
| 14                 | 1428     | 1432     | $\alpha$ -Trans-bergamoteno | 0,27       |
| 15                 | 1437     | 1437     | $\alpha$ -Guaieno           | 0,59       |
| 16                 | 1452     | 1452     | $\alpha$ -Humuleno          | 0,59       |
| 17                 | 1483     | -        | NI                          | 0,42       |
| 18                 | 1495     | 1496     | Viridifloreno               | 0,97       |
| 19                 | 1519     | 1520     | $\alpha$ -7-Epi-selineno    | 0,50       |
| 20                 | 1576     | 1578     | Espatulanol                 | 1,03       |
| 21                 | 1583     | 1583     | Óxido de cariofileno        | 2,59       |
| 22                 | 1592     | 1592     | Viridiflorol                | 0,48       |
| Total identificado |          |          |                             | 99,58      |

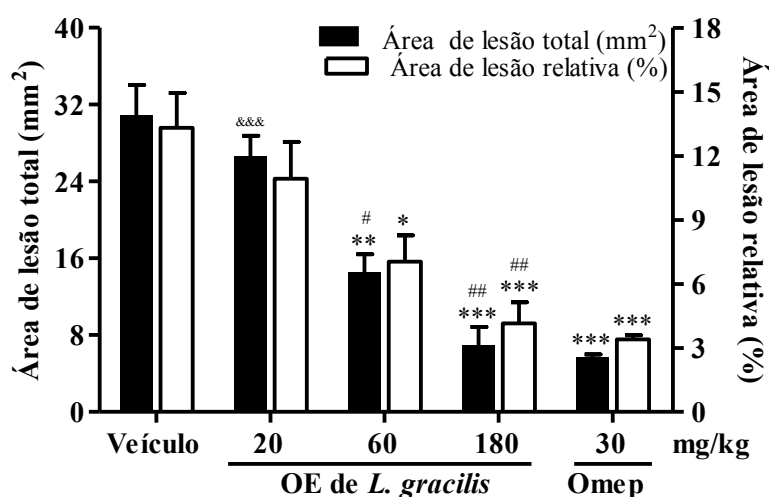
Índice de retenção relativa, experimental; RRI lit.: Índice de retenção relativa, a partir da literatura (ADAMS, 2007); %: Porcentagem do composto; NI: não identificado.



**Figura 3.** Cromatograma CG-FID do óleo essencial de folhas de *Lippia gracilis*.

## 5.2 ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO

No modelo de úlcera gástrica induzida por etanol/HCl, o pré-tratamento com o OE de *L. gracilis* produziu inibição dose-dependente nas áreas de lesão total (53,0% e 77,7% para o OE a 60 e 180 mg/kg, respectivamente,  $P < 0,01$ ) e relativa (47,1% e 68,8% para o OE a 60 e 180 mg/kg, respectivamente,  $P < 0,05$ ), em comparação com o grupo veículo (Fig. 4). O tratamento com omeprazol (Omeprazol; 30 mg/kg) também reduziu significativamente os parâmetros da úlcera gástrica (81,5% e 74,5% para as áreas de lesão total e relativa, respectivamente,  $P < 0,001$ , Fig. 4).



**Figura 4.** O efeito do OE de *L. gracilis* na prevenção de danos gástricos induzidos por etanol/HCl. Os animais foram tratados com veículo (0,2% de Tween 80 em água destilada, v.o.), OE (20,60 e 180 mg/kg, v.o.) ou omeprazol (Omeprazol; 30 mg/kg, v.o.) 45 min antes da administração de etanol a 60%/HCl a 0,3 M (10 mL/kg). As áreas de lesão total (mm<sup>2</sup>) e relativa (%) foram determinadas após 1 h. Os resultados são apresentados como as médias  $\pm$  EPM ( $n = 8$ /grupo). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  vs. grupo veículo; # $P < 0,05$  e ## $P < 0,01$  vs. OE a 20 mg/kg.

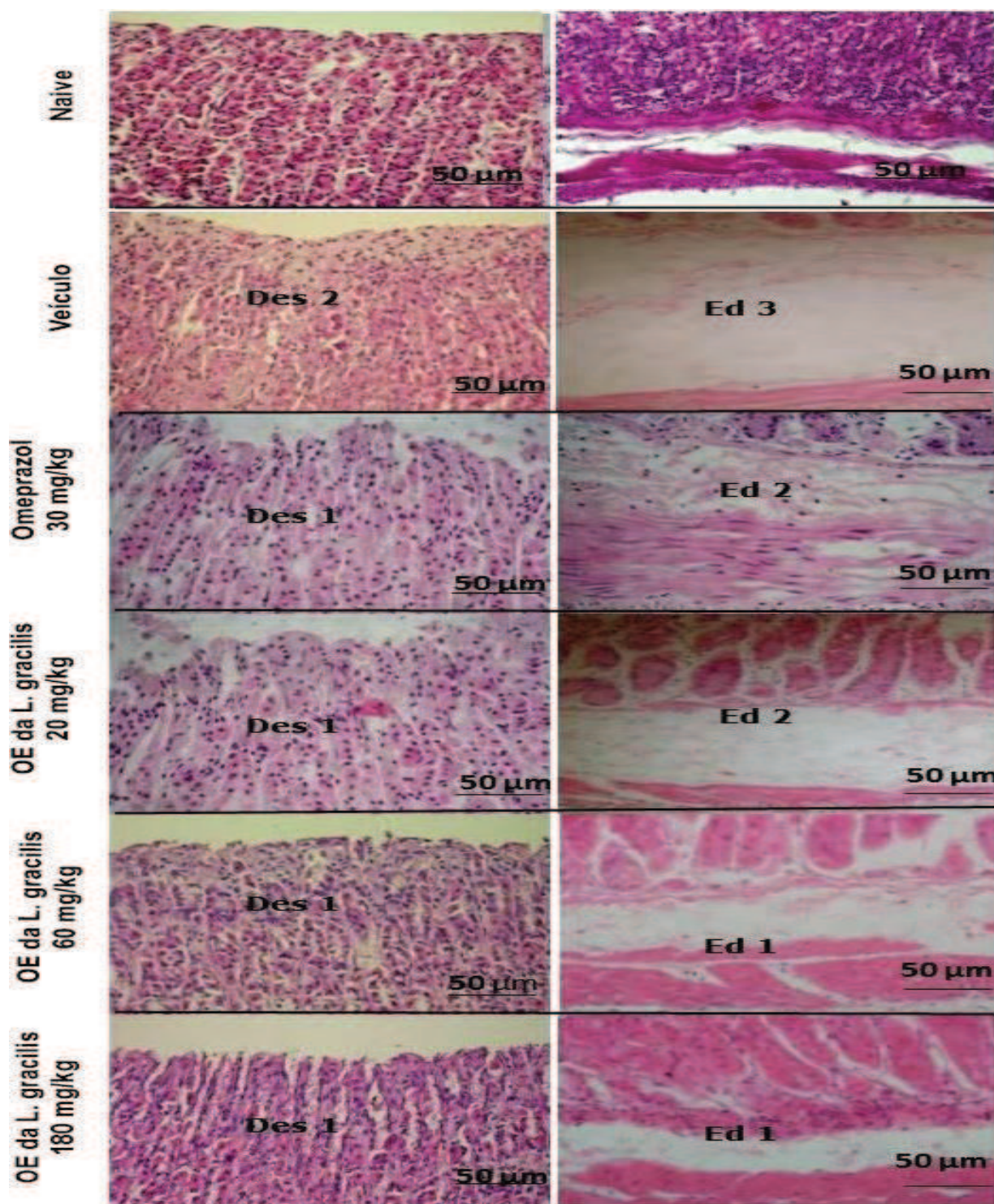
Os resultados das análises histopatológicas da mucosa gástrica são apresentados na Figura 5 e na Tabela 2. A administração de etanol acidificado

(grupo veículo) induziu danos microscópicos consistentes, que se caracterizaram por ruptura da região superficial da glândula gástrica com perda de células epiteliais, edema pronunciado da submucosa e degradação da mucosa, quando comparado ao grupo naïve (não ulcerado). Os animais tratados com OE (20, 60 e 180 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) apresentaram menor dano na mucosa quando comparados com o grupo veículo (Fig. 5 e Tabela 2).

**Tabela 2.** O efeito do óleo essencial (EO) de *Lippia gracilis* em danos microscópicos induzidos por etanol / HCl na mucosa gástrica.

| Tratamento (v.o.) | Dose<br>(mg/kg) | Perda das células<br>epiteliais<br>(score 0-3) | Edema<br>(score 0-3) |
|-------------------|-----------------|--|----------------------|
| Naïve             | -               | 0.0 (0.0-1.0)                                  | 0.0 (0.0-0.0)        |
| Veículo           | -               | 2.0 (2.0-3.0)###                               | 3.0 (2.0-3.0)###     |
| OE                | 20              | 1.0 (1.0-2.0)***                               | 2.0 (2.0-3.0)        |
|                   | 60              | 1.0 (0.0-1.0)***                               | 1.0 (0.0-1.0)***     |
|                   | 180             | 1.0 (0.0-1.0)***                               | 1.0 (0.0-1.0)***     |
| Omeprazol         | 30              | 1.0 (0.0-1.0)***                               | 2.0 (1.0-2.0)*       |

Os dados apresentados são medianas com escores mínimos e máximos entre parênteses. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. ### P < 0,001 vs grupo naïve (não ulcerado); \* P < 0,05 e \*\*\* P < 0,001 versus grupo veículo (quatro cortes histológicos de cada animal, n = 8/ grupo).



**Figura 5.** Avaliação microscópica do efeito gastroprotetor do óleo essencial (OE) da *Lippia gracilis* no modelo de úlceras gástricas induzidas. Seções histológicas representativas da mucosa gástrica coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) em modelo de úlcera aguda induzida por etanol acidificado. O grupo naive demonstra tecido gástrico sem alterações morfológicas, com epitélio gástrico preservado; o grupo veículo exibe intensa alteração na morfologia da mucosa gástrica como perda das células epiteliais (des2) e pronunciado edema da submucosa (ed3); o grupo omeprazol apresenta epitélio gástrico preservado com leve desorganização (des1) e moderado edema da submucosa (ed2); o grupo OE da *L. gracilis* na dose de 20 mg/kg demonstra leve desorganização das células epiteliais (des1) e moderado edema da submucosa (ed2); os grupos OE da *L. gracilis* nas doses de 60 e 180 mg/kg exibem morfologia compatível com a normalidade (grupo naive), com epitélio gástrico bastante preservado (des1) e leve edema da submucosa (ed1). des = desorganização; ed = edema.

### 5.3 MECANISMO ANTIULCERATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* EM ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO

No passo seguinte, para avaliar a contribuição dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores na ação protetora do OE de *L. gracilis*, os animais foram pré-tratados com ioimbina, o antagonista não seletivo de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Como mostra a Tabela 3, o efeito gastroprotetor do OE (180 mg/kg) foi parcialmente diminuído ( $P < 0,05$ ) pelo pré-tratamento com ioimbina.

Para avaliar a contribuição de compostos SH e mediador gasoso no efeito protetor do OE, outros grupos de animais foram pré-tratados com NEM ou L-NAME, respectivamente. Na Tabela 3, observamos que o efeito protetor do OE (180 mg/kg) na prevenção do dano gástrico induzido por etanol/HCl foi diminuído pelo pré-tratamento com NEM ( $P < 0,001$ ) e L-NAME ( $P < 0,05$ ).

O potencial envolvimento dos canais  $K_{ATP}$  no efeito do OE também foi considerado. Na Tabela 3, observa-se que a ação gastroprotetora do OE (180 mg/kg) foi diminuído ( $P < 0,05$ ) pelo pré-tratamento com glibenclamida.

E adicionalmente, o envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do OE também foi considerado. Na Tabela 3 verifica-se que o efeito gastroprotetor do OE (180 mg/kg) também foi diminuído ( $P < 0,001$ ) pelo pré-tratamento de animais com indometacina.

**Tabela 3.** Avaliação do papel dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores, compostos sulfidrílicos, óxido nítrico, canais de  $K_{ATP}$  e prostaglandinas no efeito gastroprotetor do óleo essencial (OE) de *Lippia gracilis* contra lesões gástricas induzidas por etanol/HCl em camundongos.

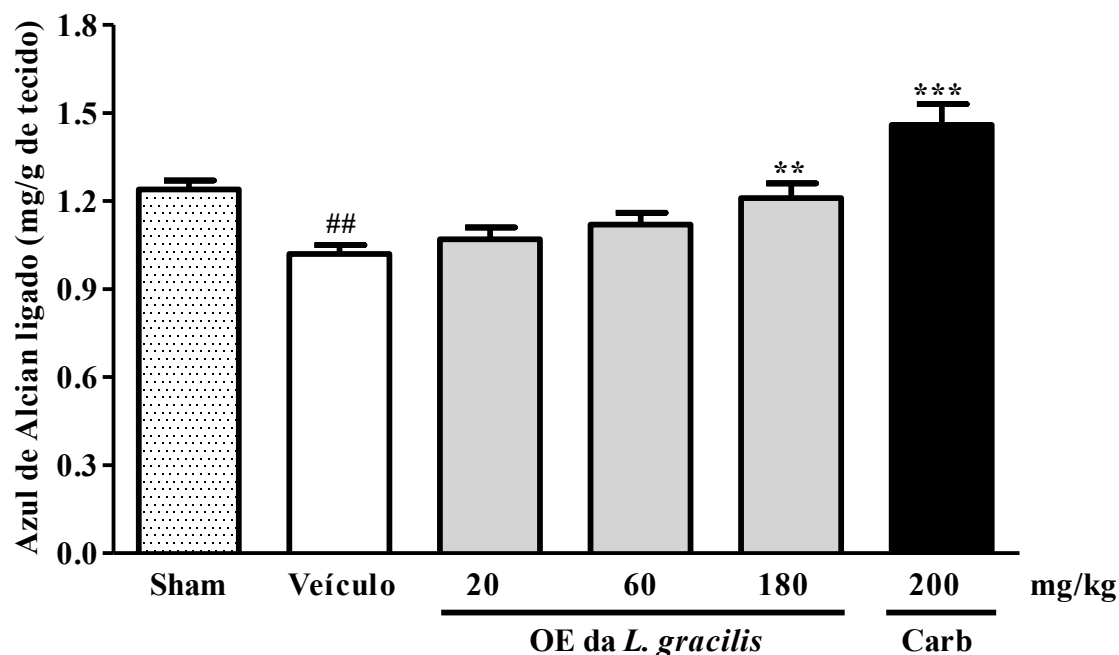
| Pré-tratamento (i.p.)              | Tratamento (v.o.)                 | Área de lesão total (mm <sup>2</sup> ) |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|
| Salina<br>(0,2% de Tween 80)       | Água destilada (0,2% de Tween 80) | 28,53 ± 2,22                           |
|                                    | OE (180 mg/kg)                    | 6,27 ± 1,09***                         |
| Ioimbina (2 mg/kg)                 | Água destilada (0,2% de Tween 80) | 43,88 ± 2,28*                          |
|                                    | OE (180 mg/kg)                    | 18,48 ± 2,55* <sup>###</sup>           |
| NEM (10 mg/kg)                     | Água destilada (0,2% de Tween 80) | 51,80 ± 1,24**                         |
|                                    | OE (180 mg/kg)                    | 62,74 ± 5,45*** <sup>###</sup>         |
| L-NAME (10 mg/kg)                  | Água destilada (0,2% de Tween 80) | 43,25 ± 2,35*                          |
|                                    | OE (180 mg/kg)                    | 16,68 ± 2,38*** <sup>###</sup>         |
| Glibenclamida<br>(10 mg/kg)        | Água destilada (0,2% de Tween 80) | 41,36 ± 2,58*                          |
|                                    | OE (180 mg/kg)                    | 17,34 ± 1,99*** <sup>###</sup>         |
| Salina (5% de NaHCO <sub>3</sub> ) | Água destilada (0,2% de Tween 80) | 28,09 ± 2,34                           |
|                                    | OE (180 mg/kg)                    | 7,04 ± 0,95***                         |
| Indometacina (10 mg/kg)            | Água destilada (0,2% de Tween 80) | 40,85 ± 1,65***                        |
|                                    | OE (180 mg/kg)                    | 37,20 ± 3,51 <sup>\$\$\$</sup>         |

NEM: N-etilmaleimida; L-NAME: Cloridrato de éster metílico de Nw-nitro-L-arginina. Resultados como média ± EPM (n = 8/grupo). A comparação estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001 comparado ao salina (0,2% de Tween 80) + água destilada; #P < 0,05 e ###P < 0,001 comparado ao salina (0,2% de Tween 80) + OE; \*P < 0,05 e \*\*\*P < 0,001 comparado ao salina (5% de NaHCO<sub>3</sub>) + água destilada; \$P < 0,001 comparado ao salina (5% de NaHCO<sub>3</sub>) + OE; &&&P < 0,001 comparado ao fármaco isolado + água destilada (na ausência do OE).



#### 5.4 DETERMINAÇÃO DO MUCO NA PAREDE GÁSTRICA

No modelo para determinação do muco, observamos que a ligadura do piloro é capaz de diminuir ( $P < 0,01$ ) a secreção de muco quando comparado ao grupo sham (animais operados sem ligadura de piloro, tratados com veículo). No entanto, nota-se que o tratamento dos animais com o OE de *Lippia gracilis* na dose de 180 mg/kg aumentou significativamente (18,6%,  $P < 0,01$ ) a produção de muco, em comparação com o grupo tratado com veículo (Figura 6). Carbenoxolona (Carb; 200 mg/kg) também aumentou significativamente a produção de muco (43,1%,  $P < 0,001$ , Fig. 4).



**Figura 6.** Efeito do óleo essencial (OE) de *Lippia gracilis*, administrado intraduodenalmente, na ligação do azul de Alcian ao muco gástrico livre a partir da ligadura de piloro. Imediatamente após a ligação do piloro, os ratos foram tratados com veículo (0,2% de Tween 80 em solução salina a 0,9%), OE (20-180 mg/kg) ou carbenoxolona (Carb; 200 mg/kg). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ /grupo). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. ## $P < 0,01$  comparado ao grupo sham; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  comparado ao grupo veículo.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO SUCO GÁSTRICO

No modelo de avaliação da secreção gástrica, utilizando a ligadura de piloro, a administração intraduodenal do OE de *L. gracilis* reduziu significativamente o volume de secreção (25,9% e 49,6% nos grupos 60 e 180 mg/kg, respectivamente,  $P < 0,05$ ) e de acidez total da secreção (30,7% e 54,3% para OE 60 e 180 mg/kg,  $P < 0,01$ ) (Tabela 4). O OE (60 e 180 mg/kg) também aumentou significativamente ( $P < 0,001$ ) o valor de pH, em comparação com o grupo veículo. A cimetidina, controle positivo e um antagonista do receptor H<sub>2</sub> de histamina, reduziu significativamente o volume de secreção gástrica em 55,8%, a acidez em 42,4% e foi capaz de aumentar o pH ( $P < 0,001$ , Tabela 4).

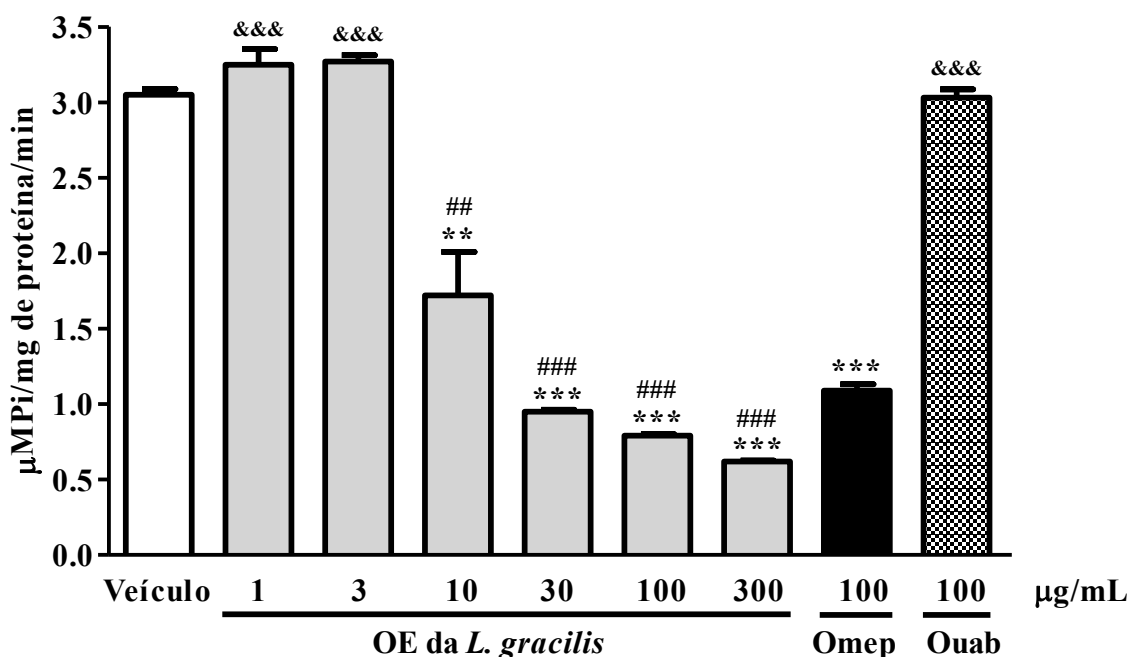
**Tabela 4.** Efeito do óleo essencial (EO) de *Lippia gracilis*, administrado intraduodenalmente, nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico obtido a partir da ligadura de piloro em camundongos.

| Tratamento | Dose<br>(mg/kg) | Volume (mL)                      | Ph                                    | [H <sup>+</sup> ] mEq/L/4 h     |
|------------|-----------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Veículo    | -               | 6,71 ± 0,48                      | 1,21 ± 0,06                           | 156,96 ± 5,14                   |
| OE         | 20              | 6,91 ± 0,46 <sup>+++</sup>       | 1,32 ± 0,08 <sup>+++</sup>            | 166,93 ± 6,11 <sup>+++</sup>    |
|            | 60              | 4,97 ± 0,50 <sup>*##</sup>       | 3,53 ±<br>0,41 <sup>***###</sup>      | 108,72 ± 13,40 <sup>***##</sup> |
|            | 180             | 3,38 ±<br>0,36 <sup>***###</sup> | 4,84 ±<br>0,45 <sup>***###&amp;</sup> | 71,75 ± 13,77 <sup>***###</sup> |
| Cimetidina | 100             | 2,70 ± 0,34 <sup>***</sup>       | 4,89 ± 0,27 <sup>***</sup>            | 90,45 ± 5,53 <sup>***</sup>     |

Resultados como média ± EPM (n = 6 / grupo). A comparação estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  comparado ao grupo veículo (ulcerado); #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  e ###  $P < 0,001$  comparado ao grupo OE 20 mg/kg; &  $P < 0,05$  comparado ao grupo OE 60 mg/kg; ++  $P @ 0,01$  e +++  $P < 0,001$  comparado ao grupo cimetidina.

## 5.6 AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. gracilis* SOBRE A ATIVIDADE DE $H^+,K^+$ -ATPASE

A Figura 7 apresenta o efeito *in vitro* do OE na atividade de  $H^+,K^+$ -ATPase numa preparação microsomal gástrica a partir de estômago de coelho. O OE nas concentrações de 10, 30, 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de diminuir a liberação de fosfato inorgânico em 43,6%, 68,9%, 74,1% e 79,7%, respectivamente ( $P < 0,01$ ). O omeprazol (inibidor de  $H^+,K^+$ -ATPase) também foi capaz de diminuir a atividade da bomba de prótons em 64,3% ( $P < 0,001$ ), enquanto a ouabaína (inibidor de  $Na^+,K^+$ -ATPase) não alterou a atividade enzimática.



**Figura 7.** Efeito *in vitro* do óleo essencial (OE) de *L. gracilis* na atividade da  $H^+,K^+$ -ATPase. A enzima foi incubada com veículo (0,5% de DMSO em água), OE (1, 3, 10, 30, 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ), omeprazol (Omeprazol; 100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou ouabaína (Ouab; 100  $\mu\text{g/mL}$ ). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  comparado ao grupo veículo; ##  $P < 0,01$  e ###  $P < 0,001$  comparado ao OE a 1 e 3  $\mu\text{g/mL}$  e ouabaína; &&&  $P < 0,001$  comparado ao omeprazol. Pi = fosfato inorgânico.

## 6. DISCUSSÃO

Nos dias atuais, duas são as abordagens básicas para o tratamento de úlceras gástricas, na busca da cura e/ou prevenção de reincidência: primeiro, a redução da produção do agente agressor (ácido gástrico), e segundo, a estimulação de fatores protetores da mucosa (ROZZA; PELLIZZON, 2012).

Com o desenvolvimento deste trabalho foi demonstrado o efeito gastroprotetor e possíveis mecanismos de ação, bem como a ação antissecretória do OE de *Lippia gracilis*.

No presente estudo foi utilizado inicialmente o modelo de indução da úlcera por etanol/HCl, por representar os efeitos do álcool em humanos. O HCl provoca severos danos à mucosa gástrica, ao passo que o etanol gera lesões necróticas por ação direta multifacetada. Danos estes possivelmente oriundos de ações biológicas como a peroxidação lipídica, formação de radicais livres e estresse oxidativo intracelular (AIRASHDI et al., 2012). Como demonstrado, o OE de *Lippia gracilis* foi capaz de prevenir, de maneira dose dependente, as lesões na mucosa gástrica induzidas pelo etanol acidificado; evento este acompanhado por diminuição do processo inflamatório (edema, perda de células) associado à úlcera gástrica. Em trabalho anterior, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se que o OE da *L. gracilis* apresenta ações anti-inflamatórias e antioxidante; portanto, seu efeito gastroprotetor pode estar relacionado, ao menos em parte, as suas propriedades antioxidante, *in vitro* e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010).

A literatura relata que vários OE de diferentes espécies de plantas apresentam atividade gastroprotetora, a qual pode estar associada as ações anti-inflamatória e antioxidante destes OE. Em estudo de MONTEIRO et al. (2007) foi realizado uma avaliação das atividades biológicas do OE de *Lippia sidoides*, pertencente ao gênero do OE estudado, e foi comprovada suas propriedades gastroprotetora, anti-inflamatória e antioxidante. Outros autores demonstraram que os OEs de açafrão e gengibre foram capazes de inibir a úlcera induzida por etanol em 84,7% e 85,1%, respectivamente, agindo estes sobre as enzimas antioxidantes GPx, SOD, catalase e GSH (LIJU; JEENA; KUTTAN, 2015).

Considerando que o OE da *L. gracilis* possui atividade gastroprotetora, ainda no modelo de úlcera induzida por etanol/HCl foram avaliados possíveis mecanismos

de ação envolvidos com este efeito. Para tanto, foram utilizadas ioimbina, glibenclamida, L-NAME, NEM e indometacina.

No grupo dos animais pré-tratados com a associação de OE e ioimbina, o efeito gastroprotetor do OE de *Lippia gracilis* foi parcialmente diminuído, sugerindo que este efeito gastroprotetor envolve a ativação destes receptores. Efeito semelhante foi observado com o OE da *Vanillosmopsis arborea*, que também teve seu efeito gastroprotetor diminuído quando os animais foram pré-tratados com ioimbina (LEITE et al., 2009). Estudo anterior mostrou a capacidade dos  $\alpha$ -2 adrenoceptores em promover gastroproteção no modelo de úlceras por etanol acidificado (GYRES et al., 2000).

É de amplo conhecimento que as prostaglandinas (PG) endógenas também desempenham importante função na manutenção da integridade da mucosa gástrica. Em estudo anterior, a PGE<sub>2</sub> mostrou-se capaz de proteger a mucosa da esofagite por refluxo ácido e prevenir a mesma de danos gástricos induzidos por etanol ou indometacina (TAKEUCHI; KATO; AMAGASE, 2010). Estes autores demonstraram que a PGE<sub>2</sub> foi capaz de promover um efeito cicatrizante sobre úlceras gástricas e lesões intestinais, por meio da ativação de receptores EP4 ligado a estimulação da angiogênese e aumento na expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (TAKEUCHI; KATO; AMAGASE, 2010).

Como demonstrado aqui, a indometacina, um anti-inflamatório não esteroide que inibe a produção de prostaglandinas, foi capaz de reverter completamente o efeito antiulcerogênico do OE de *Lippia gracilis*; demonstrando que tal efeito do OE também se dá por meio das prostaglandinas. A literatura relata que o OE da *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae) possui ação gastroprotetora via aumento na secreção de muco gástrico e níveis aumentados de PGE<sub>2</sub> (TAKAYAMA et al., 2011). Outro óleo essencial que mostrou propriedades protetoras da mucosa gástrica moduladas pela ação da PGE<sub>2</sub> é da *Citrus aurantium* (MORAES et al., 2009).

Sabe-se que parte do efeito gastroprotetor das prostaglandinas é atribuído a ativação de canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP (K<sub>ATP</sub>), considerando que ao se administrar bloqueadores destes canais observa-se diminuição deste efeito (PESKAR; EHRLICH; PESKAR, 2002). No presente estudo, utilizamos a glibenclamida, um bloqueador dos canais de K<sub>ATP</sub>, para avaliar a participação destes canais no efeito preventivo do OE de *Lippia gracilis*. O resultado revelou uma

reversão parcial no efeito protetor do OE sobre a mucosa gástrica, sugerindo que os  $K_{ATP}$  estão relacionados com este efeito.

Outro mecanismo investigado no presente estudo foi a participação do NO. Como demonstrado, o L-NAME, um inibidor da síntese de NO, reverteu parcialmente o efeito gastroprotetor do OE de *Lippia gracilis*, inferindo o envolvimento dessa via na sua ação gastroprotetora. O NO, um mediador gasoso, desempenha um importante papel no sistema de defesa gastroduodenal, justificando as suas propriedades vasodilatadoras e consequentes efeitos inibitórios na secreção de ácido gástrico (KEMMERLYD; KAUNITZA, 2014).

Para avaliar a participação dos grupamentos sulfidrílicos foi utilizado o NEM, uma droga bloqueadora destes grupamentos, e o resultado foi uma completa reversão do efeito gastroprotetor do OE de *Lippia gracilis*, apontando esta via como um provável mecanismo pelo qual o OE consegue prevenir as úlceras provocadas pelo etanol acidificado.

Os grupamentos sulfidrílicos tem como principal representante a glutathiona reduzida (GSH) e representam um importante agente defensor da mucosa gástrica, desempenhando ação antioxidante contra o efeito lesivo do etanol, além de participar na modulação da produção de muco. Esta atividade antioxidante se torna importante fator de proteção devido ao fato das espécies reativas do oxigênio estarem envolvidas na formação de úlceras gástricas (GYRES; TOTH; ZADORI, 2015).

Com o intuito de ampliar a avaliação do efeito gastroprotetor do OE de *Lippia gracilis*, foi quantificada a secreção de muco após ligadura de piloro. Como demonstrado aqui, o OE foi capaz de estimular a produção de muco, sugerindo um mecanismo adicional de gastroproteção do OE da *L. gracilis*.

O muco é capaz de proteger a mucosa gástrica mantendo um pH neutro na região próxima ao epitélio, em situações onde o pH no lúmen gástrico se encontra ácido, protegendo dessa forma o tecido gástrico da ação de ácido e pepsina, por meio de uma barreira que quando comprometida resulta na ativação de vários mecanismos, entre eles reparação epitelial rápida, aumento do fluxo sanguíneo e neutralização da acidez intracelular (PHILLIPSON et al., 2008; ALLEN; FLEMSTROM, 2005).

A bomba  $H^+, K^+$ -ATPase gástrica é responsável pela secreção de ácido gástrico, fato que a torna um notório alvo terapêutico no desenvolvimento de

tratamento para doenças relacionados com o ácido. São várias as drogas da classe dos inibidores da bomba de prótons (IBPs), as quais são consideradas as mais eficazes entre os fármacos supressores de ácido. Os IBPs são os fármacos mais prescritos em todo o mundo para o tratamento da úlcera gástrica (SYED; NAQVI, 2016; SHIN; MUNSON; SACHS, 2011). O resultado da avaliação do OE de *Lippia gracilis* sobre a atividade da  $H^+, K^+$ -ATPase revelou redução na liberação de fosfato inorgânico dose-dependente a partir da concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , evidenciando seu efeito antissecretório.

Acredita-se que o efeito gastroprotetor do OE de *Lippia gracilis* possa ser resultante de uma ação conjunta dos seus constituintes, uma vez que tanto os constituintes majoritários quanto os minoritários tem atividade gastroprotetora descrita na literatura, com participação de diferentes mecanismos nos seus respectivos efeitos.

RIBEIRO et al. (2016a) estudaram o monoterpeno timol, um dos constituintes majoritários do OE de *L. gracilis*, e verificaram que este possui ações gastroprotetoras nas úlceras aguda (etanol e AINES) e crônica (ácido acético), efeito este possivelmente mediado por prostaglandinas e canais  $K_{ATP}$ , com aumento da quantidade de muco.

O monoterpeno carvacrol, outro constituinte majoritário do OE de *L. gracilis*, teve seu efeito gastroprotetor comprovado por OLIVEIRA et al. (2012), em modelos de úlceras induzidas por etanol, etanol acidificado, ibuprofeno e isquemia/reperfusão.

Em estudo de SANTOS, RAO (2001) foi observada a capacidade do 1,8-cineol, um constituinte minoritário do OE de *L. gracilis*, de diminuir as lesões gástricas provocadas pelo etanol em ratos. Posteriormente, CALDAS et al. (2015), expôs o papel do 1,8-cineol como agente cicatrizante da úlcera, mencionando os possíveis mecanismos de ação como: capacidade de aumentar o muco gástrico; ação antioxidante, preservação dos grupos sulfidrilicos e atenuação a peroxidação lipídica; e capacidade de cura.

O  $\alpha$ -pineno, outro constituinte minoritário do OE de *L. gracilis*, se mostrou capaz de inibir as lesões gástricas induzidas pelo etanol, reduzir o volume e a acidez do suco gástrico, e ainda aumentar a produção do muco da parede gástrica (PINHEIRO et al., 2015).

Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa, foram avaliados efeitos protetores do flavonóide baicaleína e possíveis mecanismos envolvidos. O resultado apresentado foi similar ao do OE da *L. gracilis*, protegendo a mucosa gástrica de danos de agentes agressores por participação de  $\alpha$ -2adrenoceptores, NO, grupamentos SH, prostaglandinas e canais  $K_{ATP}$  (RIBEIRO et al., 2016b). Comprovando que produtos naturais são importantes fontes de substâncias para tratamento de úlceras gástricas, promovendo seu efeito por meio de vários mecanismos, abordando fatores agressores e protetores, o que ainda não é possível com os fármacos utilizados atualmente para o tratamento desta doença.



## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos comprovam que o OE da *Lippia gracilis* possui efeito gastroprotetor nas úlceras agudas, com possível participação dos  $\alpha$ -2adrenoceptores, NO, prostaglandinas, canais  $K_{ATP}$  e destaque para grupamentos SH. O tratamento com o OE da *Lippia gracilis* aumentou a produção de muco e diminuiu a secreção gástrica.

Os dados deste trabalho constituem importantes evidências favoráveis ao uso futuro do OE da *Lippia gracilis* como possível ferramenta terapêutica no tratamento das úlceras gástricas.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar o efeito cicatrizante do óleo essencial da *Lippia Gracilis* em modelo crônico de úlcera induzida por ácido acético;
- Investigar o efeito gastroprotetor do óleo essencial da *Lippia Gracilis* em modelo de úlcera induzida por indometacina;
- Avaliar a atividade antissecretória ácida com estimulação por Pentagastrina, Betanecol e Histamina;

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, N. S. Proton pump inhibitors: potential adverse effects. *Curr. Opin. Gastroenterol.* v. 28, p. 615–620, 2012.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. D.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Of Ethnopharm.* v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol.* v. 288, p.1-19, 2005.
- ALRASHDI , A..S.; SALAMA , S.M.; ALKIYUMI, S.S.; ABDULLA, HADI, M. A.; A. H. A.; ABDELWAHAB, S.; TAHA, M. M.; HUSSIANI , J.; ASYKIN N. Mechanisms of Gastroprotective Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Jasminum sambac* against HCl/Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. *Evidence-Based Complem. and Altern. Medic.* v. 2012, doi:10.1155/2012/786426.
- BALOGUN, S.O.; DAMAZO, A.S.; de OLIVEIRA MARTINS, D.T. *Helicteres saccarolha* A. St.-Hill. et al.: gastroprotective and possible mechanism of actions in experimental animals. *J. of Ethnopharmac.,* v. 26, p. 176-184, 2015.
- BATISTA, L.M.; LIMA, G.R.; DE ALMEIDA, A.B.; MAGRI, L.P.; CALVO, T.R.; FERREIRA, A.L. Ulcer healing and mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of fractions obtained from *Syngonanthus arthrotrichus* and *Syngonanthus bisulcatus*, B.M.C. *Comp. Altern. Med.,* v.15, 327-345, 2015.
- BI, W-P.; MAN, H-B.; MAN, M-Q. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. *World J Gastroint. Pathophysiol.* v. 20, p.17020-17028, 2014.
- BITU, V. C. N.; FECUNDO, H. T. F.; DA COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; RODRIGUES, F. F. G., SANTANA, N. M.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, R. A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. *Nat. Prod. Res.* v. 28, p. 399–402, 2014.
- BRADFORD, G. S.; TAYLOR, C. T. Omeprazole and Vitamin B<sub>12</sub> Deficiency. *The Annals of Pharmacotherapy.* v. 33, p. 641- 43, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. SUS tem fitoterápicos para doenças simples. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>. Acesso em 09 de Agosto de 2016.

BUJANDA, L. The Effects of Alcohol Consumption Upon the Gastrointestinal Tract. *The Am. J. Of Gast.* v. 95, p. 3374-3382, 2000.

CARLI, D. M.; PIRES, R. C.; ROHDE, S. L.; KAVALCO, C. M.; FAGUNDES, R. B. Peptic ulcer frequency differences related to *H. Pylori* or AINES. *Arq. Gastroent.* v. 52, p.46-49, 2015.

CHRISTEN, P.; CUENDET, M. Plants as a Source of Therapeutic and Health Products. *Chimia.* v.66, p. 320-323, 2012.

CHU, S.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. *Cur. Opin. In Gastroent.* v. 28, p.587-593, 2012.

CORLETO, V. D.; FESTA, S.; DI GIULIU, E.; ANNIBALE, B. Proton pump inhibitor therapy and potential long-term harm. *Curr. Opin. Endocrinol. Obes.* v. 21, p. 3-8, 2014.

DEY, L.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Brit. J. of pharm.* v. 149, p. 611-623, 2006.

DI MARIO, F.; GONI, E. Gastric acid secretion: Changes during a century. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* v. 28, p.953-965, 2014.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A.R.; CALLIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmac. Res.* V. 112, p. 4-29, 2016.

EL-DEMERDASH, E. L.; EL-MESALLAMY, H. O. ; ABU-ZAID, N. M.; GAD, M. Z. The potential therapeutic effect of nitric oxide modulators in experimentally-induced gastric ulcers. *Drug Disc. & Therap.* v. 4, p.276-284, 2010.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.* v. 66, p. 375-392, 1925.

FOX, R. K.; MUNIRAJ, T. Pharmacologic Therapies in Gastrointestinal Diseases. *Med. Clin. Of North America.* v. 100, p.827-850, 2016.

GEMICI, B.; WALLACE, J. L.; Anti-inflammatory and Cytoprotective Properties of Hydrogen Sulfide. *Met. in Enzym.,* v. 555, p.169-193, 2015.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. *Acta. Bot. bras.* V. 24, p. 395-406, 2010.

GOMES, A.S.; LIMA, L.M.; SANTOS, C.L.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA M.H. LPS from *Escherichia coli* protects against indomethacin induced gastropathy in rats—role of ATP-sensitive potassium channels. *Eur J Pharm.,* v. 547, p. 136–142, 2006.

GUILHON, C. C.; RAYMUNDO, L. J.; ALVIANO, D. S.; BLANK A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATHEUS, M. E.; CAVALCANTI, S. C.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. J. Of Ethnopharm. v. 135, p.406-413, 2011.

GYIRES, K.; RONAI, A.Z. ; MULLNER, K. ; FURST, S. Intracerebroventricular injection of clonidine releases  $\beta$ -endorphin to induce mucosal protection in the rat. Neuropharm., v. 39, p. 961–968, 2000.

GYIRES, K.; TOTH, V.E.; ZADORI. Gastric mucosal protection: from the periphery to the central nervous system. Journal Of Phys. And Pharm. v. 66, p.319-329, 2015.

HUNT, R. H.; CROWE, S. E.; EL-OMAR, E. M.; FOX, J. G.; KUIPERS, E. J.; MALFERTHEINER, P.; MC COL, K. E. L.; PRITCHARD, D. M.; RUGGE, M.; SONNENBERG, A.; SUGANO, K.; TACK, J. The stomach in health and disease. Gut ,v. 64, p. 2650-1668, 2015.

ITO, T.; JENSEN, R. T. Association of Long-term Proton Pump Inhibitor Therapy with Bone Fractures and effects on Absorption of Calcium, Vitamin B12, Iron, and Magnesium. Curr Gastroenterol Rep. v. 12, P. 448-457, 2010.

KANGWAN, N.; PARK, J-M.; KIM, E-H.; HAHM, K. B. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. World J Gastrointest Pathophysiol. v. 5, p.40-47, 2014.

KEMMERLYD, T.; KAUNITZA, J. D. Gastroduodenal Mucosal Defense. Curr Opin Gastroenterol. v. 30, P.583–588, 2014.

KUBO, K.; UEHARA, A.; KUBOTA, T.; NOZU, T.; MORUYA, M.; WATANABE, Y. Effects of ranitidine on gastric vesicles containing H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase adenosine triphosphatase in rats. Scand. J. Gastroenterol. v. 30, p.944-951, 1995.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. Gastroenterology, v. 135, p.41-60, 2008.

LEITE, G. DE O.; PENHA A. R. DA; FERNANDES, C. N.; SOUZA, H. H. F.; COSTA, J. G. M. DA; CAMPOS, A. R. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. Fitoterapia, v.80, p. 77–80, 2009.

LEONTIADIS, G.; MOLLOY-BLAND, M.; MOAYYEDI, P.; HOWDEN, C. W. Effect of Comorbidity on Mortality in Patients With Peptic Ulcer Bleeding: Systematic Review and Meta-Analysis. The American Journal Of Gastroenterology, v. 108, p.331-345, 2013.

LIJU, V. B.; JEENA, K.; KUTTAN, R. Gastroprotective activity of essential oils from turmeric and ginger. J Basic Clin Physiol Pharmacol; v. 26, p. 95–103, 2015.

MAGIEROWSKI, M.; JASNOS, K.; KWIECIEN, S.; DROZDOWICZ, D.; SURMIAK, M.; STRZALKA, M.; PTAK-BELOWSKA, A.; WALLACE, J. L.; BRZOZOWSKI, T.

Endogenous Prostaglandins and Afferent Sensory Nerves in Gastroprotective Effect of Hydrogen Sulfide against Stress-Induced Gastric Lesions. Plos One. v. 10, p. 1-21, 2015b.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T. Gaseous Mediators Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in the Mechanism of Gastrointestinal Integrity, Protection and Ulcer Healing. Molecules. v. 20, p.9099-9123, 2015a.

MEDEIROS, J.V.R.; GADELH, GG; LIMA, S.J.; GARCIA, J.A.; SOARES, P.M.G.; SANTOS, A.A.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.L.P. Role of the NO/cGMP/KATP pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. British Journal of Pharmacology, v.153, p. 721–727, 2008.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. Journal of Ethnopharmacology. v. 129, p. 391-397, 2010.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats, Jpn. J. Pharmacol. v. 33, p. 939-945, 1983.

MONTEIRO, M. V.; LEITE, A. K. R. M.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. Journal of Ethnopharmacology. v.111, p 378–382, 2007.

MORAES, T. M.; KUSHIMAA, H.; MOLEIROA, F. C.; SANTOS, R. C. ; ROCHA, L. R. M. ; MARQUES, M. O. ; VILEGAS, W. ; HIRUMA-LIMA, C. A. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. Chemico-Biological Interactions, v. 180, p. 499–505, 2009.

NAJM, W. I. Peptic Ulcer Disease. Primary Care: Clinics in Office Practice, v. 38, p.383-394, 2011.

OLIVEIRA, A. F. DE; CARVALHO, J. R. DE; COSTA, M. DE F. DOS S.; LOBATO, L. C. DA P.; SILVA, R. S. DA; SCHRAMM, J. M. DE A. Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. Epidemiol. Serv. Saúde, v. 24, p. 45-154, 2015.

OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F. V. DA; VIANA, A. F S. C.; SANTOS, M. R. V. DOS; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MARTINS, M. DO C. C.; NUNES, P. H. M.; OLIVEIRA, F. DE A.; OLIVEIRA, R. DE C. M. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol) v.385, p.899–908, 2012.

OVERMIER, J. B.; MURISON, R. Restoring Psychology's Role in Peptic Ulcer. Applied Psychology: Health and Well-Being, v. 5, p.5-27, 2012.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology. v. 76, p. 201-214, 2001a.

PASCUAL, M.E; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E.; VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Farmaco, v. 56, p. 501-504, 2001b.

PEREZ, S.; MECKES, M.; PEREZ, C.; SUSUNAGA, A.; ZAVALA, M.A. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. Journal of Ethnopharmacology. v. 102, p. 1-4, 2005.

PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B. A. Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in Prostaglandin Mediated Gastroprotection in the Rat. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS. v. 301, p.969–974, 2002.

PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B.A. Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in ProstaglandinMediated Gastroprotection in the Rat. The journal of pharmacology and experimental therapeutics. v. 301, p. 969-974, 2002.

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M. E. V.; HENRIKSNAS, J.; PETERSSON, J.; GENDLER; SANDLER, S.; PERSSON, A. E. G.; HANSSON, G. C.; HOLM, V. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. v. 295, p.806–G812, 2008.

PRINZ, C.; ZANNER, R. ; GRATZL, M. Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. Annu. Rev. Physiol., v. 65, p. 371–82, 2003.

RASHIDIAN, A.; REZAYAT, S.; FARHANG, F.; VAHEDI, H.; DEHPOUR, A.R.; EJTEMAI MEHR, S.; MEHRZADI, S. Anticonvulsant effects of *Lippia citriodora* (Verbenaceae) leaves ethanolic extract in mice: Role of gabaergic system. International Journal Of Preventive Medicine, v. 7, p.97-0, 2016.

RIBEIRO, A.R.S.; VALENÇA, J.D.DO N.; SANTOS, J.DA S.; BOEING, T.; DA SILVA L. M.;S. F. DE ANDRADE; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C. ; THOMAZZI, S. M. The effects of baicalein on gastric mucosal ulcerations in mice: Protective pathways and anti-secretory mechanisms. Chemico-Biological Interactions, v. 260, p. 33-41, 2016b.

RIBEIRO, A.R; PINHEIRO, M. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L.; THOMAZZI, S. M. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K(+) channels, and gastric mucus secretion. Chemicol-biological interactions. v. 25, p. 121-128, 2016a.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. J Ethnopharmacol. v. 143, p. 656-663, 2012.

ROZZA, A.L.A.L.; PELLIZZON, C.H.C.H. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. *Fundamental And Clinical Pharmacology*, v.1, p. 1-13, 2012

SANDLER, S. J.; PERSSON, S.; HANSSON, A. E. G.; HOLM, G. C. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. v. 295, p. 806–812, 2008.

SANTOS, F. A.; RAO, V.S. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Digestive diseases and sciences*. v.46, p. 331-337, 2001.

SCHUBERT, M. L. \_Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. v. 27, p.536-542, 2011.

SCHUBERT, M. L. \_Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. v. 30, p.578-82, 2014.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. *Gastroenterology*. v. 134, p.1842-1860, 2008.

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D. ; GRUENSTEIN, M. ; SIPIET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*. v. 5, p.43-61, 1945.

SHIN, J. M.; MUNSON, K.; SACHS G. Gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Comprehensive Physiology*. v. 1, p. 2141-2153, 2011.

SHUJAA, N.; AL-KHRASANI M.; ZADORI, Z.S., ROSSI M.; MATYUS, P.; NEMETH J.; HEIN L.; GYIRES, K.  $\alpha$ -2-Adrenoceptor agonist-induced inhibition of gastric motor activity is mediated by  $\alpha$ 2A-adrenoceptor subtype in the mouse. *Neurochemistry International*, v.58, p. 708–713, 2011.

SILVA, M.I.; MOURA, B.A.; NETO, M.R.; TOMÉ ADA, R.; ROCHA, N.F.; DE CARVALHO, A.M.; ET AL., Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. *Naunyn Schmiedeb. Arch. Pharmacol.*, v. 380, p. 233-245, 2009.

SILVA, W. J., DÓRIA, G. A. A., MAIA, R. T., NUNES, R. S., CARVALHO, G. A., BLANK, A. F., ALVES, P. B., MARCAL, R. M., CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p. 618-626, 2008.

SUN, X.-B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol*. v. 43, p. 699-704. 1991.

SYED, A.A.; NAQVI A.S.H Proton pump inhibitors use; beware of side-effects. J. Pak Med Assoc. v.66, p.1314-1318, 2016.

TAKAYAMAA, C.; DE-FARIA, F.M.B; ALMEIDA A. C. A. DE; VALIM-ARAÚJO, D. DE A. E O.; REHENA, C. S.; DUNDER, R. J.; SOCCA, E. A. R.; MANZO L. P.; ROZZA, A. L.; SALVADOR, M. J. ; PELLIZZONE, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LUIZ-FERREIRA; SOUZA-BRITO A.; A. R. M. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). Journal of Ethnopharmacology. v.135, p.147–155 2011.

TAKEUCHI, K. Gastric cytoprotection by prostaglandin e2 and prostacyclin: relationship to ep1 and ip receptors. J. of Physiol. and Pharm, v. 65, p.3-14, 2014.

TAKEUCHI, K.; KATO, S.; AMAGASE, K. Prostaglandin EP Receptors Involved in Modulating Gastrointestinal Mucosal Integrity. J Pharmacol Sci, v. 114, p.248-261, 2010.

TAKEUCHI, K.; KITA, K.; HAYASHI, S.; AIHARA, E. Regulatory mechanism of duodenal bicarbonate secretion Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide. Pharm. & Therap., v.130, p. 59–70, 2011.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. Dig. Dis. And Sciences. v. 50, p. 24-33, 2005.

TONETO, M. G.; OLIVEIRA, F. J. M.; LOPES, M. H. I.; Evolução histórica da úlcera péptica: da etiologia ao tratamento. Sci. Med. v. 21, p. 23-30, 2011.

TUSKEY, A.; PEURA, D. The use of H2 antagonists in treating and preventing NSAID-induced mucosal damage. Arth. Resch. & Therapy. v. 15, doi:10.1186/ar4178, 2013.

VERAS, H.N.H.; RODRIGUES, F.F.G.; BOTELHO, M.A.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; DA COSTA, J. G. M. Antimicrobial Effect of *Lippia sidoides* and Thymol on *Enterococcus faecalis* Biofilm of the Bacterium Isolated from Root Canals. The Scientific World Journal. doi.org/10.1155/2014/471580, 2014.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself?. Physiological Reviews. v. 88, p.1547-1565, 2008.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. Current Gastroenterology Reports. v. 17, p.17-24, 2015.

YAO, X; FORTE, J. G. Cell Biology of acid Secretion the Parietal Cell. Annu. Ver. Physiol., v. 65, p. 103-31, 2003.

ZÁDORI, Z. S.; SHUJAA, N.; BRANCATI, S.B.; HEIN, L.; Gyires, K. Both  $\alpha 2B$ - and  $\alpha 2C$ -adrenoceptor subtypes are involved in the mediation of centrally induced gastroprotection in mice. Eur. J. of Pharm. v. 669, p. 115-120, 2011.





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
 COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação das atividades protetora e cicatrizante dos óleos essenciais da *Croton argyrophyllus* e *Lippia gracilis* na úlcera gástrica de camundongos.”, registrada com o nº 41/2016, sob a responsabilidade da Profª. Drª. Sara Maria Thomazzi que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 05/10/2016.

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica  |
| Vigência da autorização | Início: 01/11/2016, Término: 31/07/2017   |
| Espécie/linhagem/raca   | Camundongo heterogênico/Swiss   |
| Nº de animais           | 174 (M) 174 (F) = 348   |
| Peso/Idade              | 25-30g / 3 meses  |
| Sexo                    | M / F   |
| Origem                  | Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. |

*Josemar SENA BATISTA*

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA  
 Coordenador do CEPA/UFS